Aus der Abteilung Laboratoriumsdiagnostik der
Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta F.R.C.Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER CYTOPLASMATISCHEN REZEPTOREN FÜR DIHYDROTESTOSTERON, PROGESTERON UND ÖSTRADIOL IM GEWEBE MENSCHLICHER PROSTATA, DAS DURCH TRANSURETHRALE ELEKTRORESEKTION GEWONNEN WURDE

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Ulrich Rumschik
aus Ravensburg

1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546514_0023

Aus der Abteilung Laboratoriumsdiagnostik der
Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta F.R.C.Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER CYTOPLASMATISCHEN REZEPTOREN FÜR DIHYDROTESTOSTERON, PROGESTERON UND ÖSTRADIOL IM GEWEBE MENSCHLICHER PROSTATA, DAS DURCH TRANSURETHRALE ELEKTRORESEKTION GEWONNEN WURDE

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Ulrich Rumschik
aus Ravensburg

1984

Dekan: Professor Dr. H. D. Waller

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. H. Moeller

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Harzmann

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODE	3
2.1.	Herkunft des Untersuchungsmaterials	3
2.2.	Histologische Beurteilung der TUR-Späne	3
2.3.	Einfrieren und Aufbewahrung der Gewebeproben	4
2.4.	Auswahl der Gewebeproben für die Analyse	4
2.5.	Chemikalien	5
2.6.	Messung der Radioaktivität	5
2.7.	Proteinbestimmung	6
2.8.	DNA-Bestimmung	6
2.9.	Aufarbeitung des Gewebes	6
2.9.1.	Homogenisation	6
2.9.2.	Ultrazentrifugation	8
2.9.3.	Inkubation	8
2.9.4.	Separierung spezifisch gebundener von unspezifisch gebundenen Steroidhormonen mit Hilfe der Agargelelektrophorese	10
2.9.5.	Fraktionierung der Agargelelektrophorese	11
2.10.	Auswertung	12
3.	ERGEBNISSE	13
3.1.	Einleitung	13
3.2.	Fraktionierung der Agargelelektrophorese - graphische Auswertung -	14
3.3.	Kurvenverlauf bei der Bestimmung von DHT-, Progesteron- und Östradiolrezeptoren	15
3.4.	Rezptorgehalt im normalen Prostatagewebe und im Gewebe von Prostatacarcinomen	15
3.5.	Vergleich der Rezeptorprofile im Normal- und Carcinomgewebe einzelner Patienten	17

Seite

3.6.	Verhältnis der Rezeptorsorten zueinander in jeweils einer Gewebeprobe	18
3.7.	Zusammenfassung der Ergebnisse	19
3.8.	Abbildungen 1 bis 13	21
4.	DISKUSSION	34
4.1.	Qualität des untersuchten Materials	34
4.1.1.	Wärmebedingte Denaturierung der Rezeptorproteine	34
4.1.2.	Auswirkung von Einfrieren und Lagerung auf die Rezeptorproteine	36
4.1.3.	Homogenität des Gewebes	38
4.2.	Inkubation und DHT-Metabolismus	39
4.2.1.	Austausch zwischen endogenem und exogenem Hormon	39
4.2.2.	Vor- und Nachteile der Langzeitinkubation	40
4.2.3.	Mengenmäßiger Anteil des endogenen DHT im Inkubationsansatz	40
4.2.4.	DHT-Metabolismus	41
4.2.5.	Anwendung des Enzyms NADase zur Unterdrückung des DHT-Metabolismus	43
4.3.	Wahl der Liganden	44
4.3.1.	Einleitung: radioaktive und synthetische Liganden	44
4.3.2.	Affinität des Methyltrienolon, R 1881, zum DHT-Rezeptor	44
4.3.3.	Spezifität von Methyltrienolon	45
4.3.4.	Eigenschaften von Promegeston, R 5020	47
4.3.5.	Eigenschaften von Östradiol	49
4.4.	Wahl der Separierungsmethode	50
4.4.1.	Eigenschaften spezifisch und unspezifisch bindender Proteine	50
4.4.2.	Übersicht über die gebräuchlichsten Separierungsmethoden	51
4.4.3.	Anwendungsgebiete und Grenzen des "Charcoal assay"	52

		Seite
4.4.4.	Vorteile der Agargelelektrophorese	53
4.4.5.	Dissoziationsvorgänge während der Agargelelektrophorese	53
4.4.6.	Probleme bei der Agargelelektrophorese	54
4.5.	Auswertung der Agargelelektrophorese	55
4.5.1.	Parameter zur Qualitätskontrolle	55
4.5.2.	Systematischer Fehler beim Rezeptornachweis durch Supprimierung der spezifischen Bindung	56
4.5.3.	Korrektur des systematischen Fehlers	57
4.5.4.	Anwendungsbereich und Grenzen der Korrekturformel	57
4.5.5.	Auswertung bei geänderten Voraussetzungen	58
4.6.	Wertigkeit von DNA- bzw. Proteingehalt als Bezugsgröße für die gemessene Rezeptorkonzentration	59
4.6.1.	Erläuterung der Problematik an Beispielen	59
4.6.2.	Gründe für die Bevorzugung des DNA-Gehaltes als Bezugsgröße	61
4.7.	Deutung der negativen Werte	61
4.7.1.	Bedeutung des DHT-Reststoffwechsels	61
4.7.2.	Zufällige Fehler	62
4.7.3.	Denaturierung der Rezeptorproteine	63
4.7.4.	Bindungsverhältnisse im heißen und im supprimierten Ansatz	63
4.8.	Grundlagen der statistischen Auswertung	65
4.8.1.	Wertigkeit des normalen Prostatagewebes als Bezugspunkt zur Beurteilung des veränderten Rezeptorprofils im Carcinomgewebe	65
4.8.2.	Gründe für die gemeinsame Betrachtung von wenig differenzierten Adenocarcinomen und anaplastischen Carcinomen	68
4.8.3.	Auswahl der Werte und Aussagekraft der Statistik	68
4.9.	Ergebnisse anderer Autoren	69
4.9.1.	Erläuterungen zu Tabelle III	69

Seite

4.9.2. Schwierigkeiten beim Vergleich der einzelnen Ergebnisse 70

4.9.3. Vergleich der Methoden und des Materials 73

4.9.4. Vergleich von DHT und R 1881 als Ligand für den DHT-Rezeptor 73

4.10. Diskussion der eigenen Ergebnisse 74

4.10.1. Unterschiede zwischen normalen Prostatagewebe und Prostata-carcinomgewebe 74

4.10.2. Anwesenheit des Östradiolrezeptors im Prostatacarcinomgewebe 75

4.10.3. Beurteilung der bei der Bestimmung der Progesteronrezeptoren gewonnenen Ergebnisse 75

4.10.4. Vergleich von Carcinom- und Normal-gewebe je eines Patienten 76

4.10.5. Aussagekraft der Quotienten $Ö_2$-R/Pg-R, $Ö_2$-R/DHT-R, Pg-R/DHT-R 76

4.11. Klinische Beobachtungen 77

4.11.1. Daten zu den vier nachbeobachteten Patienten 77

4.11.2. Vergleich der Rezeptorprofile von hormonsensiblen und hormontauben Carcinomen 78

4.11.3. Korrelation der Prognose des Prostata-carcinoms mit dem Rezeptorprofil bei anderen Autoren 80

4.11.4. Abschließende Betrachtungen 80

5. ZUSAMMENFASSUNG 82

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 84

7. LITERATURVERZEICHNIS 86

8. ANHANG 97

DANKSAGUNG

LEBENSLAUF

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Seit Ch. HUGGINS (HUGGINS u. HODGES, 1941) die Bedeutung der Androgene für das Wachstum des Prostatacarcinoms erkannte, hat es nicht an Versuchen gefehlt, die Wirkung dieser Hormone bei Patienten mit Prostatacarcinom aufzuheben bzw. ihr Vorhandensein im Organismus auf ein Minimum zu reduzieren. In den Fällen, wo eine radikale Entfernung des Tumors nicht mehr in Frage kommt und wegen fortgeschrittener Metastasierung nur noch palliative Maßnahmen angewandt werden, werden auch heute noch hohe Östrogendosen zur Suppression der Gonadotropinausschüttung oder Antiandrogene verabreicht. Um die Bildung der Androgene vollkommen zu verhindern, kommt die Kastration, eventuell kombiniert mit Entfernung der Nebennierenrinde oder Hypophysektomie, zur Anwendung. Die Östrogentherapie ist mit einer relativ hohen Rate an kardiovaskulären Komplikationen verbunden. Die operativen Methoden stellen, vom Operationsrisiko selbst einmal abgesehen, einen nicht zu unterschätzenden Eingriff in die Persönlichkeit des Patienten dar. Die Tatsache, daß einige Prostatacarcinome primär nicht auf diese hormonablative Therapie ansprechen und viele Tumoren im Laufe der Behandlung ihre Hormonsensibilität verlieren, ließ berechtigte Zweifel an der Theorie des hormonabhängigen Tumorwachstums aufkommen.

Die Meinung, daß die intrazelluläre Bindung von Steroidhormonen an spezifische Rezeptorproteine eine Vorbedingung für die Hormonwirkung ist, ist heute eine allgemein akzeptierte Modellvorstellung (JENSEN und DeSOMBRE, 1972; MAINWARING, 1977). Somit können Steroidhormone nur in solchen Geweben eine Wirkung entfalten, die über die entsprechenden Rezeptoren verfügen. Es ist deshalb sinnvoll, zu Beginn einer hormonablativen Therapie ein Rezeptorprofil zur Identifizierung hormonsensibler Prostatacarcinome zu erstellen, wie das bei Mammacarcinomen bereits üblich ist.

Die Bestimmung dieser Rezeptorprofile nahmen wir im Cytosol von Prostatacarcinomgewebe vor, das durch transurethrale Elektroresektion gewonnen wurde. Da die TUR als Palliativmaßnahme bei metastasierendem Prostatacarcinom heute die Methode der Wahl ist, fallen TUR-Resektionsspäne im klinischen Betrieb reichlich an. Um nach der Palliativoperation gleich die weiteren therapeutischen Maßnahmen zu entscheiden, ist es notwendig, über eine Methode zu verfügen, mit der der Nachweis von Steroidhormonrezeptoren im TUR-Gewebe möglich ist.

Das Ziel unserer Arbeit war es, die von R.K. WAGNER (1978) beschriebene und die von H. MOELLER et al. (1980) modifizierte Methode hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit auf dieses Problem zu überprüfen. Daneben sollten die mit dieser Methode bestimmten Rezeptorprofile in Verbindung mit dem klinischen Verlauf Aufschluß über die Prognose einer hormonablativen Therapie geben.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Herkunft des Untersuchungsmaterials

Unser Untersuchungsmaterial, Gewebe von Patienten mit Prostatacarcinom, erhielten wir von Dr. S.H. Flüchter (Chirurgische Universitätsklinik Tübingen, Abteilung für Urologie - Direktor Prof. Dr. H.-H. Bichler). Bei keinem dieser Patienten war zuvor eine Hormon- oder chirurgische Behandlung des Carcinoms durchgeführt worden.

2.2. Histologische Beurteilung der TUR-Späne

Bei den zu untersuchenden Proben handelt es sich um Gewebsspäne, die durch transurethrale Elektroresektion (TUR) gewonnen wurden. Aus jedem Span wurde etwa am Übergang vom mittleren zu den beiden äußeren Dritteln jeweils eine Gewebsscheibe entnommen und zur histologischen Beurteilung an das pathologische Institut der Universität Marburg versandt, wo Prof. Dr. Schmitz-Moormann den histologischen Befund nach Kriterien von BÖCKING et al. (1979) erstellte. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung wurden folgendermaßen verschlüsselt:

I. Diagnose:
- 0 = normal
- 1 = Adenomyomatose
- 2 = Prostatitis
- 3 = Carcinom

Kombinationen dieser Befunde waren nicht aufgeführt.

II. Ausdehnung des Carcinoms (Schätzwerte):
- 1 = 0 - 25 %
- 2 = 26 - 50 %
- 3 = 51 - 75 %
- 4 = 76 - 100 %

III. Histologisches Grading:

1 = hochdifferenziertes Adenocarcinom
2 = wenig differenziertes Adenocarcinom
3 = cribriformes Carcinom
4 = solide anaplastisches Carcinom

IV. Cytologisches Grading:

1 = geringe Kernaplasie
2 = mäßige Kernaplasie
3 = starke Keraplasie

2.3. Einfrieren und Aufbewahrung der Gewebeproben

Nach der Entnahme der Proben für die Histologie wurden die Gewebsspäne in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verarbeitung bei - 70° C aufbewahrt.

2.4. Auswahl der Gewebeproben für die Analyse

Zur Analyse gelangte nur Carcinom- oder normales Gewebe. Bei der Auswahl der Carcinomproben legten wir Wert darauf, daß beide untersuchten Scheiben eines Spanes den größtmöglichen Gehalt an Carcinomgewebe, also 76 - 100 % aufwiesen, um mit einiger Sicherheit davon ausgehen zu können, daß das zu untersuchende Gewebe histologisch weitgehend homogen ist. Gleiches gilt für Proben normalen Gewebes, wo wir nur solche Späne verwandten, deren beide untersuchten Scheiben für normal befunden worden waren, im Diagnoseschlüssel (s.o.) also 0/0. Insgesamt untersuchten wir 34 Gewebeproben. Davon waren 13 Proben normales

Drüsengewebe, 9 wenig differenzierte Adenocarcinome und 17 anaplastische Carcinome.

2.5. Chemikalien

Allgemein gängige Chemikalien hatten den Reinheitsgrad "pro analysi" und waren von der Firma Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen worden. Radioaktive Steroide waren von der Firma New England Nuclear geliefert worden. Nicht radioaktiv markierte Steroide, nämlich Methyltrienolon R1881 und Promegeston R5020 erhielten wir ebenfalls von New England Nuclear, nicht markiertes Östradiol von Serva.

5a-Dihydrotestosteron:	1,2-^{3}H	50,6 Ci/mmol	17β-Hydroxy-5 α-androstan-3-on
Promegeston:	17α-Methyl-^{3}H	87,0 Ci/mmol	17α,21-Dimethyl-19-norpregna-4,9(10)-dien-3,20-dion
Östradiol:	6,7-^{3}H (N)	52,0 Ci/mmol	1,3,5(10)-Östratrien-3,17 B-diol

2.6. Messung der Radioaktivität

Die β-Aktivität der mit Tritium markierten radioaktiven Steroide zählten wir abwechselnd in dem Gerät Betaszint BF 5003A (Berthold, Bad Wildbad) mit 60,5 % Zahlausbeute bzw. im Packard Tri Carb Scintillation Spectrometer Modell 2002 mit 47 % Zählausbeute. Als Szintillationsflüssigkeit diente Unisolve I (Zinsser, Frankfurt).

2.7. Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wandelten wir die Methode von SCHAFFNER und WEISSMANN (1973) ab. Je 2 x 5 µl der Probe wurden auf Zelluloseacetat-Folie (Membranfolie, Katalog Nr. 11200, Sartorius, Göttingen) pipettiert, bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Analyse aufbewahrt.

Die Membranen wurden 10 Minuten in eine Färbelösung eingelegt (1 g Amidoschwarz 10 B, 450 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, 450 ml H_2O), dann 3 x 3 Minuten in Entfärbelösung gewaschen (900 ml Methanol, 20 ml Essigsäure, 80 ml H_2O). Die noch gefärbten Proteinflecken wurden ausgeschnitten und einzeln in je einem Reagenzglas mit 1 ml "Verreißlösung" aufgelöst (100 Trichloressigsäure, 800 ml Ameisensäure, 100 ml Essigsäure). Die Extinktion wurde bei 620 nm gemessen. Als Standard diente Rinderserumalbumin, dessen Eichkurve im Bereich von 1 - 20 µg Protein linear verläuft.

2.8. DNA-Bestimmung

DNA bestimmten wir nach der Methode von BURTON (1956), jedoch mit Desoxyribose als Standard. Die Eichkurve ist im Bereich von 2 - 12 µg DNA linear.

2.9. Aufarbeitung des Gewebes

2.9.1. Homogenisation

Zur Analyse gelangten Gewebeproben mit einem Gewicht zwischen 50 und 200 mg.. Das bei -70° C gelagerte Prostatagewebe wurde in Teflonkapseln (Schüttelbehälter, Braun Melsungen), die in flüssigem Stickstoff vorgekühlt worden waren, gegeben. Diese Kapseln enthielten zusätzlich eine Wolframcarbidkugel von 10 mm Durchmesser. Das Homogenisieren

erfolgte mit Hilfe des Mikrodismembranators (Braun, Braun Melsungen). Es handelt sich dabei um ein Gerät, in das die obengenannten Kapseln eingespannt und mit einer Frequenz von 50 Hz geschüttelt werden können.
Dabei prallt die in der Kapsel enthaltene Wolframkugel aufgrund ihrer Massenträgheit gegen die Kapselwände und zerkleinert so die gefrorene Gewebeprobe. Wir homogenisierten 3 x 30 Sekunden, jeweils unterbrochen von 30 Sekunden Kühlung in flüssigem Stickstoff. So war gewährleistet, daß sich das Gewebe während des Homogenisierens keinesfalls über 0° C erwärmen konnte. Zu dem so erhaltenen Gewebepulver wurden in die Kapsel 400 µl eiskalter NADase-DST-Puffer gegeben (1,9 mg NAD Nucleosidase, 0,8 IU/mg Protein, von N. Crassa, Sigma München, in 4 ml DST-Puffer gelöst)

DST-Puffer

Dithioerythrit	0,050 M
Saccharose	0,250 M
NaN_3	0,005 M
Tris-(hydroxy)-methylaminomethan	0,010 M

bei 4° C mit HCl auf pH 7,4 eingestellt. Alsdann wurde die Teflonkapsel solange in der Hand erwärmt, bis der Kapselinhalt zu tauen anfing. Das aufgetaute Gewebepulver suspendierten wir, indem wir die Flüssigkeit 10 - 15 mal durch eine abgeschliffene Lumbalkanüle in vorgekühlte Insulinspritzen aufsogen. Dabei achteten wir darauf, die Spritzen nicht mit den Fingern zu erwärmen.

Die so entstandene Suspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Daraufhin spülten wir die Teflonkapsel mit 200 µl NADase-DST-Puffer, um auch die letzten Reste der Suspension daraus zu entfernen, was uns wegen der geringen Menge an eingesetztem Gewebe nötig schien, und gaben auch diese 200 µl ins Zentrifugenröhrchen.

2.9.2. Ultrazentrifugation

Insgesamt wurden also 600 µl bei 100 000 g (40 000 rpm im Rotor 70.1 Ti, Ultrazentrifuge Modell L5-65/75 B, Beckman Instruments, München) 30 min. lang zentrifugiert.

Danach wurde der Überstand, sap genannt, mittels einer vorgekühlten Insulinspritze, auf die eine abgeschliffene Lumbalkanüle aufgesetzt war, abgezogen und zur Bestimmung der Androgen-, Progestin- und Östrogenrezeptoren weiterverwandt. (Tabelle I, Seite 9).

2.9.3. Inkubation

Zur Markierung der Hormonrezeptoren im sap verwandten wir für Androgenrezeptoren radioaktives Dihydrotestosteron (^{3}H-DHT), für Progestinrezeptoren radioaktives Promegeston (^{3}H-R5020), für Östrogenrezeptoren radioaktives Östradiol (^{3}H-E_2). Um eine Rezeptorart zu bestimmen, waren zwei Ansätze erforderlich.

Ansatz 1 und Ansatz 2 enthielten das jeweils zur Bestimmung einer Rezeptorart benötigte radioaktive Steroid in einer Konzentration von $3{,}33 \times 10^{-8}$ M, Ansatz 2 zusätzlich nicht markiertes Hormon in hundertfachem Überschuß, also einer Konzentration von $3{,}33 \times 10^{-6}$ M. Ansatz 1, der nur radioaktives Steroid enthielt, nannten wir den "heißen" Ansatz, Ansatz 2 den "supprimierten" Ansatz.

Die Endkonzentrationen der übrigen im Inkubationsmedium enthaltenen Substanzen waren 0,01 M Tris, 0,042 M Dithioerythrit, 0,21 M Saccharose, 0,0042 M NaN_3. Die Konzentration von NAD-Nucleosidase während der Inkubation betrug 40 µg/100 µl, was 32 m IU/100 µl entspricht. Die Proteinkonzentration lag zwischen 1 und 5 g/l.

Tab. I: Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze im einzelnen:

		1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2
^{3}H-DHT	4 x 10^{-7}M	5 µl	5 µl	-	-	-	-
^{3}H-R 5020	4 x 10^{-7}M	-	-	5 µl	5 µl	-	-
^{3}H-E_2	4 x 10^{-7}M	-	-	-	-	5 µl	5 µl
R 1881	4 x 10^{-5}M	-	5 µl	-	-	-	-
R-5020	4 x 10^{-5}M	-	-	-	5 µl	-	-
E_2	4 x 10^{-5}M	-	-	-	-	-	5 µl
Tris		5 µl	-	5 µl	-	5 µl	-
sap		50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Von dem nicht zur Inkubation verwandten sap pipettierten wir 2 x 5 µl zur Proteinbestimmung, wie unter 2.7. beschrieben, auf Zelluloseacetat-Folie. DNA bestimmten wir aus dem Sediment nach der Ultrazentrifugation, nachdem dieses weiteren Arbeitsschritten zur Extraktion der Kernrezeptoren (Rolf STINGEL, Dissertation Tübingen, in Vorbereitung) unterzogen worden war.

Nach gründlichem Mischen der Ansätze wurden diese 22 Stunden lang bei 0 - 4° C stehen gelassen, um sie dann mit Hilfe der Agargelelektrophorese weiter zu verarbeiten.

2.9.4. Separierung spezifisch gebundener von unspezifisch gebundenen Steroidhormonen mit Hilfe der Agargelenkelektrophorese

Die für die Elektrophorese benötigten Geräte sind im Max-Planck-Institut für Zellbiologie Wilhelmshaven, Abteilung Prof.Dr.P.W. Jungblut (jetzt Max-Planck-Institut für Experimentelle Endokrinologie, Hannover) entwickelt und von WAGNER (1978) ausführlich beschrieben worden.

Die Gießformen für die Agargelplatten, die Stanze für die Startlöcher, sowie die Elektrophoresekammer mit Kühlblock und der Gelschneideapparat wären von der Firma Hölzel (Dorfen) bezogen worden. Die Gelplatten enthielten 0,81 % Agar purum (Behring, Marburg), 0,9 % Agarose (Behring, Marburg) in 0,05 M Michaelispuffer (0,02 M Natriumdiäthylbarbiturat, 0,03 M Natriumacetat, 0,003 M NaN_3 bei 4° C mit HCl auf pH 8,2 eingestellt.) Sie wurden in einer Höhe von ca. 5 mm auf Glasplatten gegossen (100 x 85 x 0,7 mm). Die so hergestellten Agarplatten wurden bei 0 - 4° C aufbewahrt und spätestens 24 Stunden danach weiterverarbeitet. Dazu wurden unmittelbar vor Gebrauch, parallel zur kürzeren Kante der Platte, 10 Startlöcher zur Aufnahme der Proben in das Gel gestanzt (Durchmesser 3,6 mm, Abstand 9 mm). Als

Elektrodenpuffer diente 0,1 M Michaelispuffer (0,04 M Natriumdiathylbarbiturat, 0,06 M Natriumacetat, 0,006 M NaN_3). Als Ionenbrücken benutzten wir Filtrierpapier.

Unmittelbar vor Beginn der Elektrophorese pipettierten wir zu jedem der Inkubationsansätze 50 µl DST-Puffer. Von den nunmehr 110 µl pro Ansatz wurden je 50 µl zur Elektrophorese in jedes zweite Startloch pipettiert. Wir ließen jeweils eine Bahn zwischen zwei Startlöchern frei, um eine Beeinträchtigung der Trennschärfe durch Seitdiffusion zu vermeiden. Weitere 50 µl dienten zur Bestimmung des sogenannten Nullwertes. Das ist die Aktivität, die pro 50 µl Inkubat gefunden wird. Ein Vergleich des Nullwertes mit dem pro Bahn wiedergefundenen Wert nach beendeter Elektrophorese, die theoretisch beide gleich sein müßten, diente uns als Kriterium für sorgfältiges Arbeiten. Der Rest von 10 µl je Ansatz wurde verworfen.

Während der 2 Stunden dauernden Elektrophorese wurde der Strom auf konstant 90 mA pro Platte gehalten (Netzanschlußgerät 121280, DESAGA, Heidelberg), die Temperatur des Agargels blieb durch Kühlung des Kühlblocks mit - 6° C kaltem Isopropanol zwischen 3 und 5° C.

2.9.5. Fraktionierung der Agargelelektrophorese

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gelplatten in 10 Längsbahnen parallel zur Feldrichtung und dann in 26 Fraktionen zu 3 mm Breite senkrecht zur Feldrichtung geschnitten. Damit entstanden je Bahn 26 Fraktionen, ausgehend von der anodischen Seite mit 1 bis 26 fortlaufend durchnummeriert, so daß das Startloch einer jeden Bahn genau auf die Grenze zwischen Fraktion 13 und 14 zu liegen kam.

Die Gelstücke wurden einzeln in Betazählgefäße (Volumen 20 ml, Zinsser, Frankfurt) gegeben und mit 10 ml Unisolve I (Zinsser, Frankfurt) versetzt. Die radioaktiven Moleküle wurden innerhalb von 24 Stunden zu 97 - 99 % in die Szintillationsflüssigkeit extrahiert und dann ihre Aktivität im Betazähler BF 5003 A (Berthold, Bad Wildbad) mit 60,5 % Zählausbeute bzw. dem Packard Tri Carb Scintillation Spectrometer Modell 2002 mit 47 % Ausbeute gezählt.

2.10. Auswertung

Wir fanden einen anodischen und einen kathodischen Peak von radioaktiven Verbindungen. Den anodischen Peak für Ansatz 1 nannten wir A_1, den kathodischen Peak B_1. Entsprechend erhält man für den Ansatz 2 einen anodischen Peak A_2 und einen kathodischen Peak B_2. Nach Literaturangaben (u.a, WAGNER, 1978b) nahmen wir an, daß der anodische Peak das rezeptorgebundene Hormon enthält, während der kathodische Peak den Anteil des nicht gebundenen Steroids darstellt. Die Differenz $\Delta = A_1 - A_2$ nannten wir supprimierbare Bindung. Einem Vorschlag von Günther OETTLING (Dissertation Tübingen, in Vorbereitung) folgend, korrigierten wir die supprimierbare Bindung mit dem Quotienten der kathodischen Peaks nach der Formel

$$\Delta_{korr} = A_1 - A_2 \times \frac{B_1}{B_2} .$$

3. ERGEBNISSE

3.1. Einleitung

Insgesamt wurden 34 Gewebsproben von 11 verschiedenen Patienten analysiert, die sich folgendermaßen aufteilen: 13 Proben normalen Gewebes, 9 Proben waren Adenocarcinome, 12 anaplastische Carcinome.

Die Umrechnung der Zählrate, counts per minute (cpm), in fmol erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{fmol} = \text{cpm} \times \frac{100}{E \times 2{,}22 \times 10^{12} \times \text{S.A.}} \quad \frac{\text{min}^{-1}}{\text{min}^{-1} \times \text{mmol}^{-1}}$$

Es bedeuten:

cpm	:	counts per minute
E	:	Effektivität des Zählgerätes in Prozent
S.A.	:	spezifische Aktivität
$2{,}22 \times 10^{12}$	:	Anzahl der Zerfallsakte pro Minute, die der Aktivität 1 Curie entspricht.

Für die so errechnete Zahl an Bindungsstellen wählten wir zwei verschiedene Bezugsgrößen, nämlich den Protein- bzw. DNA-Gehalt, der entsprechenden Probe. Diese Werte korrelieren im allgemeinen recht gut. In Einzelfällen können jedoch beträchtliche Unterschiede auftreten.

Durch ein Mißgeschick gingen in unserem Labor drei DNA-Proben verloren, so daß wir von den insgesamt 34 Gewebeproben nur 31 auf DNA bezogene Werte angeben können.

3.2. Fraktionierung der Agargelelektrophorese - graphische Auswertung -

Die in den folgenden Abschnitten zu besprechenden Ergebnisse sind in den Abbildungen 1 bis 13 unter Punkt 3.8. zusammengefaßt.

Nachdem die Radioaktivität der einzelnen Gelstücke, wie unter Punkt 2.9.5. beschrieben, in einem Szintillationszähler bestimmt worden war, erfolgte eine graphische Aufzeichnung der gefundenen Meßwerte (Abb. 1 - 3). Auf der Abszisse sind die einzelnen Gelfraktionen von 1 - 26 aufgetragen, auf der Ordinate die counts per minute. Die linke Seite des Schaubildes, Gelfraktionen 1 - 12 und die Hälfte von Fraktion 13 entspricht der anodischen Seite der Agargelplatte. Die rechte Seite der Graphik zeigt die andere Hälfte von Fraktion 13 und die Fraktion 14 - 26, sie entspricht der kathodischen Seite der Gelplatte. Die durchgezogene Linie zwischen Fraktion 13 und 14 bezeichnet den Startpunkt der Elektrophorese. Die Dreiecke entsprechen Ansatz 1, dem "heißen Ansatz", Kreise, durch gestrichelte Linien miteinander verbunden dem,"kalten", das heißt, supprimierten Ansatz 2. Die Punkte symbolisieren die Differenz $\Delta = A_1 - A_2$, also die supprimierbare Bindung.

Da wir die rezeptorgebundenen Steroidhormone auf der anodischen Seite erwarteten, haben wir hier, mit Ausnahme von Gelfraktion 1 und 2, jede Fraktion einzeln gemessen. Auf der Kathodenseite, wo sich die radioaktiven Steroide an SHBG gebunden finden und auch in freier Form vorliegen, waren wir nicht so sehr an einem hohen Auflösungsvermögen interessiert, so daß wir der Einfachheit halber ab Fraktion 14 jeweils die Aktivität zweier Gelstücke zusammen maßen und die Fraktionen 23 - 26 zu einer Fraktion zusammenfaßten. Weil freie und nicht rezeptorgebundene Steroidmoleküle in wesentlich größerer Menge vorkommen als der spezifische Hormon-Rezeptor Komplex, mußten wir auf der Kathodenseite,

wo wir keine spezifische Bindung erwarten einen,anderen Ordinatenmaßstab anwenden.

3.3. Kurvenverlauf bei der Bestimmung von DHT-, Progesteron- und Östradiolrezeptoren

Abbildung 1 stellt die Kurve für DHT-Rezeptoren dar. Man erkennt einen für die supprimierbare Bindung charakteristischen Peak zwischen Fraktion 7 und 9. Häufig wurden in der Nähe des Startlochs, Fraktion 13, erhöhte Aktivitäten für Ansatz 1 und 2 gefunden. Das gleiche Phänomen tritt auch in Abbildung 2, der Kurve für Progesteronrezeptoren in Erscheinung. Hier tritt allerdings, durch Überwiegen der Aktivität in Ansatz 1, ein startlochnaher Peak für die supprimierbare Bindung auf. Man hat somit zwei Gipfel, die eine supprimierbare Bindung repräsentieren. Der erste erstreckt sich von Fraktion 6 - 10, während der zweite, bei Fraktion 13, häufig, aber durchaus nicht immer vorhanden ist. Bei unserer Auswertung haben wir jeweils nur den ersten Peak bei Fraktion 6 - 10 berücksichtigt. Die überzeugendsten Ergebnisse lieferte die Auswertung der Aktivitäten der Ansätze bei der Bestimmung der Östradiolrezeptoren (Abb. 3). Man sieht hier einen scharfen, hohen Peak bei Fraktion 6 und 7 ohne störende Nebenerscheinungen.

Teil B der Kurven zeigt für alle drei Rezeptorarten einen gleichartigen Verlauf.

3.4. Rezeptorgehalt im normalen Prostatagewebe und im Gewebe von Prostatacarcinomen

In Abbildung 4 - 9 werden Proben normalen Prostatagewebes mit Adenocarcinomen und anaplastischen Carcinomen der Prostata verglichen. In Abbildung 4, 6 und 8 werden die fmol Bindungsstellen auf ein Milligramm DNA bezogen, in Abbildung

5, 7 und 9 auf ein Milligramm Protein. Die große Streubreite der Werte machte es erforderlich, einen logarithmischen Maßstab zu wählen.

Abbildung 4 zeigt, welcher DHT-Rezeptorgehalt in den einzelnen Gewebearten angetroffen wird. Die Punkte der untersten Zeile symbolisieren Proben normalen Prostatagewebes. Die Dreiecke der zweiten Zeile bedeuten wenig differenzierte Adenocarcinome. Die oberste Zeile schließlich, ausgefüllte Dreiecke, stellen anaplastische Carcinome dar. Diese Symbole haben bei allen Diagrammen die gleiche Bedeutung.

Wie man sieht, hat die Analyse des DHT-R Gehaltes in fast einem Drittel der Fälle negative Werte ergeben (Abb. 4 u. 5). Zwischen Adenocarcinomen und anaplastischen Carcinomen ist hinsichtlich des DHT-R Gehalts kein Unterschied feststellbar. Auch die Analyse der Proben normalen Gewebes, verglichen mit den Carcinomproben ergibt keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,2$). Allerdings finden wir sehr hohe DHT-R Konzentrationen, über 1000 fmol/mg DNA nur bei normalem Gewebe und nie bei Carcinomen.
In Abbildung 5 ist der Bezugswert für die DHT-Konzentration 1 mg Protein. Es ergibt sich bei dieser Art der Darstellung kein grundsätzlicher Unterschied zu Abbildung 4.

Betrachtet man die Diagramme für den Pg-R, Abbildung 6 und 7, so zeigt sich ein ähnliches Bild. Negative und positive Werte halten sich in etwa die Waage. Während sich bei Normalgewebe und anaplastischen Carcinomen zwischen 100 und 800 fmol Bindungsstellen pro mg DNA nachweisen lassen, sind es bei Adenocarcinomen nur zwischen 80 und 100 fmol. Dieser Unterschied hat sich jedoch nicht als statistisch signifikant erwiesen.

In diesem Zusammenhang ist eine kurze Erläuterung zur Durchführung unserer Signifikanztests notwendig. Wir haben

hierbei nämlich nur positive Werte berücksichtigt. Damit wird eine Auslese getroffen, die das Ergebnis eventuell verfälscht. Andererseits stellen wir nur dort signifikante Unterschiede fest, wo negative Werte fast nicht vorkommen, nämlich bei den Östradiolrezeptoren (s. 4.8.4.).

Deren Verteilungsmuster ist in Abbildung 8 und 9 dargestellt. Während sich die Zahl der $Ö_2$-R Bindungstellen bei anaplastischen und Adenocarcinomen wiederum ähnelt, zeigen Proben normalen Gewebes eine wesentlich höhere Aktivität, mit bis über 100 000 fmol Bindungsstellen pro mg DNA. Betrachtet man anaplastische und Adenocarcinome zusammen als eine Stichprobe, Normalgewebsproben als die andere Stichprobe, so unterscheiden sich die beiden Stichproben im doppelten t-Test mit Varianzanalyse auf dem Signifikanzniveau p = 0,05 signifikant voneinander.

3.5. Vergleich der Rezeptorprofile im normalen und Carcinomgewebe einzelner Patienten

Von vier Patienten erhielten wir sowohl normales Drüsengewebe wie auch Carcinomgewebe. Damit war es möglich, die jeweiligen Unterschiede zwischen Carcinom- und normalem Gewebe bei einem Individuum zu bestimmen. Die graphische Auswertung der Analyse der Gewebsproben dieser vier Patienten sieht man in Abbildung 10 - 12. Was den logarithmischen Maßstab und die verwendeten Symbole angeht, so gilt das bereits oben Gesagte.

In Abbildung 10 sieht man die Auswertung für den DHT-R. Auf der linken Seite der Abbildung wird wieder fmol/mg DNA als Ordinatenmaßstab gewählt, auf der rechten Seite fmol/mg Protein. Während bei den Patienten E.J. und W.M. das Carcinomgewebe einen gegenüber Normalgewebe deutlich erniedrigten Gehalt an DHT Bindungsstellen aufweist, ein Zehntel bzw. ein Fünftel der Normalwerte, ist eine solche

Unterscheidung bei den Gewebsproben der Patienten S.A. und W.A. nicht möglich. Der Vergleich der Zahl an Progesteronbildungsstellen in Abbildung 11 läßt keine Unterschiede zwischen normalem und Carcinomgewebe erkennen. Vielmehr sind die Meßwerte weitgehend regellos verteilt.

In Abbildung 12 sind die Verhältnisse für die $Ö_2$-R dargestellt. Bei den auf DNA bezogenen Werten der linken Seite sieht man bei allen vier Patienten, daß das normale Gewebe jeweils eine zirka 10fach höhere Zahl an Östradiolbindungsstellen aufweist als die zum Vergleich dienenden Carcinomproben. Wählt man fmol/mg Protein als Bezugsgröße, so ergibt sich fast das identische Bild, mit Ausnahme von Patient W.A., wo nun das normale Gewebe zwar eine hohe, nicht aber die höchste Zahl an Bindungsstellen aufweist.

3.6. Verhältnis der Rezeptorsorten zueinander in jeweils einer Gewebeprobe

Abbildung 13 zeigt einen Vergleich der Verhältnisse der einzelnen Rezeptorsorten, DHT-R, Pg-R und $Ö_2$-R, zueinander in verschiedenen Gewebearten. Dazu wurden die Quotienten aus dem Verhältnis der Menge an Rezeptoren in jeweils einer Gewebeprobe gebildet. Da nun, wie schon erwähnt, häufig negative Werte vorkommen, vermindert sich die Zahl der Quotienten, die man bilden kann um die Anzahl der Fälle, in denen einer oder beide der in Relation zu bringenden Werte negativ waren. Die Quotienten wurden jeweils aus den auf 1 mg DNA bezogenen Werten gebildet. Es resultiert eine dimensionslose Zahl.

In der linken Spalte von Abbildung 13 ist das Verhältnis von Östradiol- zu Progesteronrezeptoren aufgezeichnet ($Ö_2$-R/Pg-R). Die Symbole zur Kennzeichnung der einzelnen Gewebearten haben die gleiche Bedeutung, wie in den vorangegangenen Abbildungen. Man sieht, daß die Quotienten

$\ddot{O}_2$-R/Pg-R bei Normalgewebe Werte zwischen 2 und 34 annehmen, bei Adenocarcinomen jedoch im Höchstfall nur Werte bis 10 erreichen und bei den anaplastischen Carcinomen gar nur bis 5. Vergleicht man die Relation von $\ddot{O}_2$-R und DHT-R, so erreicht der Quotient $\ddot{O}_2$-R/DHT-R wiederum bei normalem Gewebe die höchsten Werte (3 - 42), während Adenocarcinome (1 - 10) und anaplastische Carcinome (1 - 14) deutlich darunter liegen. Das Verhältnis von Pg-R zu DHT-R zeigt ebenfalls besondere Merkmale. Bei normalem Gewebe erhält man für den Pg-R/DHT-R Quoutienten Werte von 2 - 15, bei Adenocarcinomen nur Werte bis 2, bei anaplastischen Carcinomen bis 0,5.

Um zu prüfen, ob sich anhand dieser Quotienten signifikante Unterschiede zwischen normalem und Carcinomgewebe feststellen lassen, wandten wir auf die errechneten Werte den doppelten t-Test mit Varianzanalyse an. Dabei wurden adeno- und anaplastische Carcinome zu einer Gruppe zusammengefaßt und dem normalen Gewebe gegenüber gestellt. Demnach ist das Verhältnis von $\ddot{O}_2$-R/Pg-R im normalen Gewebe mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ signifikant höher als im Carcinomgewebe. Ebenso finden wir für das Verhältnis $\ddot{O}_2$-R/DHT-R im Normalgewebe signifikant höhere Werte ($p = 0,02$).Hinsichtlich des Verhältnisses Pg-R/DHT-R fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gewebearten.

3.7. Zusammenfassung der Ergebnisse

Beim DHT-R zeigt der Vergleich verschiedener Malignitätsstufen von Prostatacarcinomen keine Unterschiede zwischen wenig differenzierten Adeno- und anaplastischen Carcinomen. Normalgewebe ist nur in Einzelfällen anhand des hohen DHT-R Gehalts von Carcinomgewebe zu unterscheiden. Die Bestimmung des Pg-R in Prostatacarcinomen ergab ein sehr buntes Bild, das keine eindeutigen Interpretationen zuläßt.

Der $Ö_2$-R zeigt ein signifikantes Verteilungsmuster. Er ist im normalen Prostatagewebe in bis zu hundertfach größerer Menge anzutreffen als bei Carcinomen. Damit ist in den meisten Fällen eine sichere Unterscheidung der beiden Gewebearten möglich. Dieses Ergebnis ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ signifikant.

Beim Vergleich von normalem Gewebe mit Carcinomgewebe je eines Patienten sind deutliche Unterschiede wiederum nur bei der $Ö_2$-R Bestimmung zu finden. Hier weist Normalgewebe immer einen höheren Rezeptorgehalt auf als Carcinomgewebe. Beim DHT-R weisen nur in der Hälfte der Fälle die normalen Gewebe einen höheren Rezeptorgehalt auf als die Carcinomgewebe. Die Bestimmung des Pg-R brachte bei dem Vergleich von Gewebsproben je eines Patienten keine verwertbaren Ergebnisse.
Betrachtet man das Verhältnis der einzelnen Rezeptorsorten in einer Gewebeprobe zueinander, so erreicht der Quotient $Ö_2$-R/Pg-R bei Normalgewebe signifikant höhere Werte, als bei Carcinomgewebe ($p = 0,05$). Das gleiche gilt für das Verhältnis $Ö_2$-R/DHT-R ($p = 0,02$). Das Verhältnis Pg-R/DHT-R scheint genauso wenig zufälliger Natur zu sein. Allerdings hat sich der dem Augenschein nach deutliche Unterschied nicht als statistisch signifikant erwiesen.

3.8. Abbildungen 1 - 13

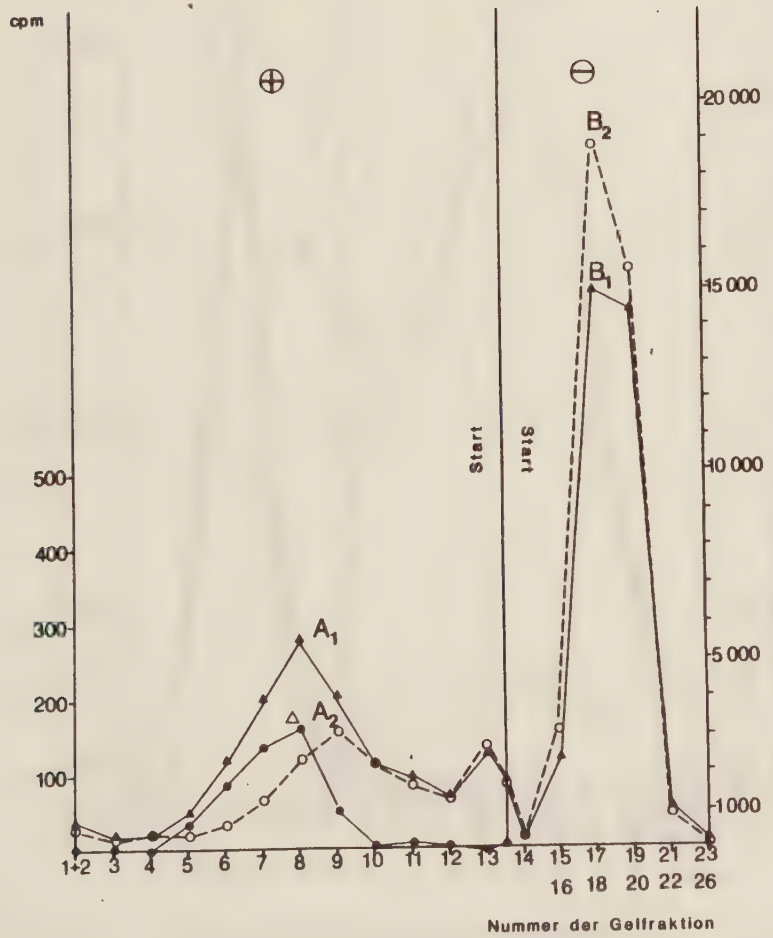


Abb. 1: Auswertung der Agargelelektrophorese für Dihydrotestosteronrezeptoren

▲ ▲ ▲ heißer Ansatz 1, ^{3}H-DHT allein

o o o kalter Ansatz 2, ^{3}H-DHT und 100facher Überschuß R1881

• • • supprimierbare Bindung $\Delta = A_1 - A_2$

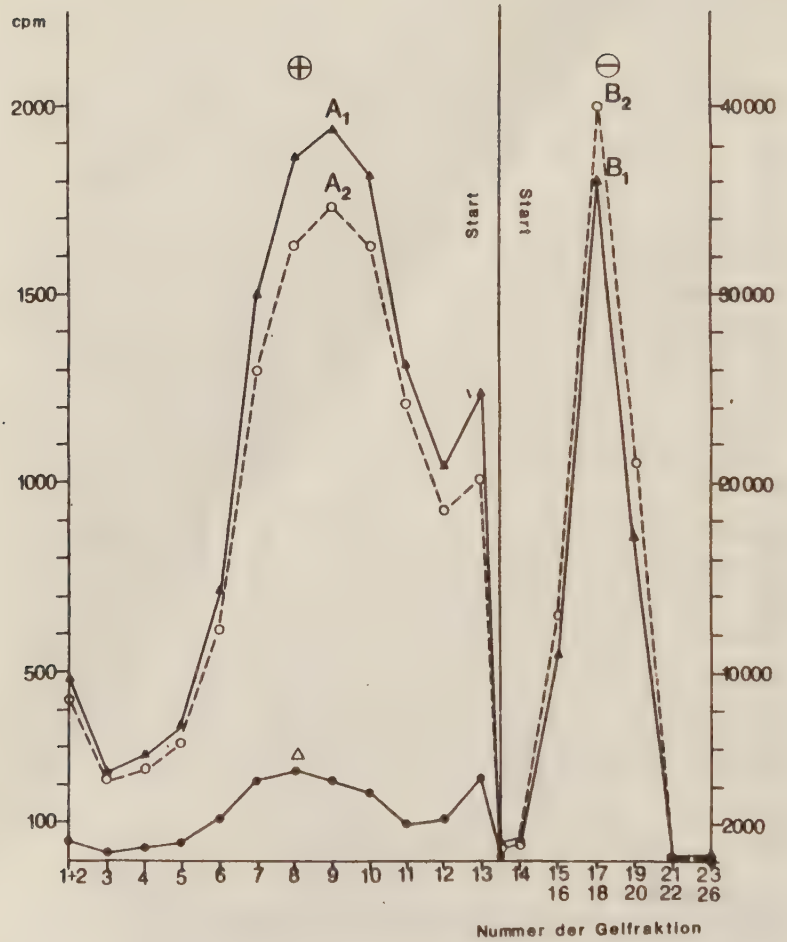


Abb. 2: Auswertung der Agargelelektrophorese für Progesteronrezeptoren

▲ ▲ ▲ heißer Ansatz 1, ^{3}H-R5020 allein

o o o kalter Ansatz 2, ^{3}H-R5020 und 100facher Überschuß R5020

• • • supprimierbare Bindung $\Delta = A_1 - A_2$

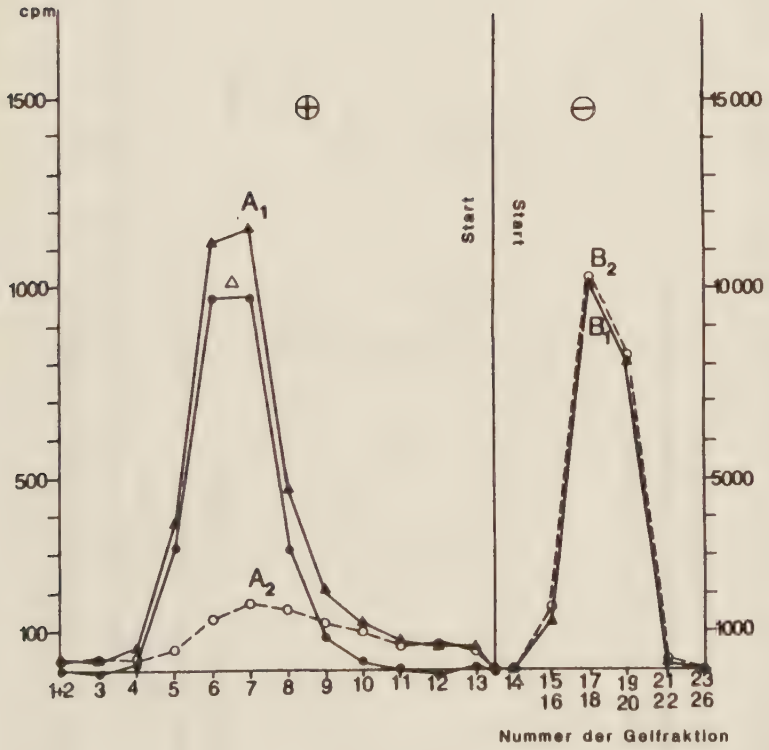


Abb. 3: Auswertung der Agargelelektrophorese für Östradiolrezeptoren

▲ ▲ ▲ heißer Ansatz 1, ^{3}H-Östradiol allein

o o o kalter Ansatz 2, ^{3}H-Östradiol und 100facher Überschuß Östradiol

• • • supprimierbare Bindung $\Delta = A_1 - A_2$

Abb. 4: Konzentration der Dihydrotestosteronrezeptoren in fmol/mg DNA in normalem Prostatagewebe und in Prostatacarcinomgewebe

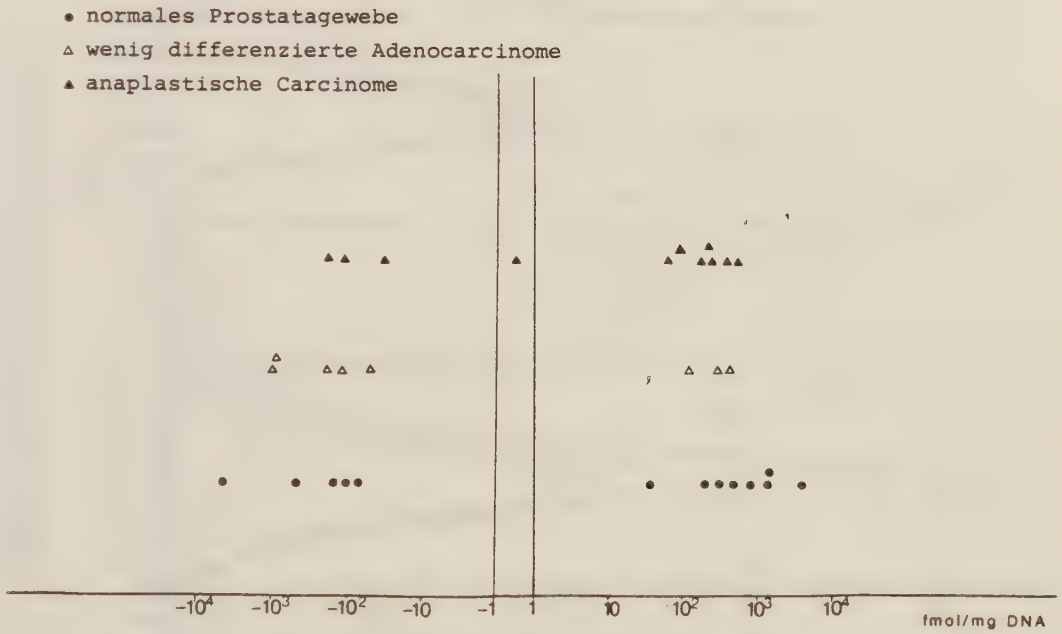


Abb. 5: Konzentration der Dihydrotestosteronrezeptoren in fmol/mg Protein in normalem Prostatagewebe und in Prostatacarcinomgewebe

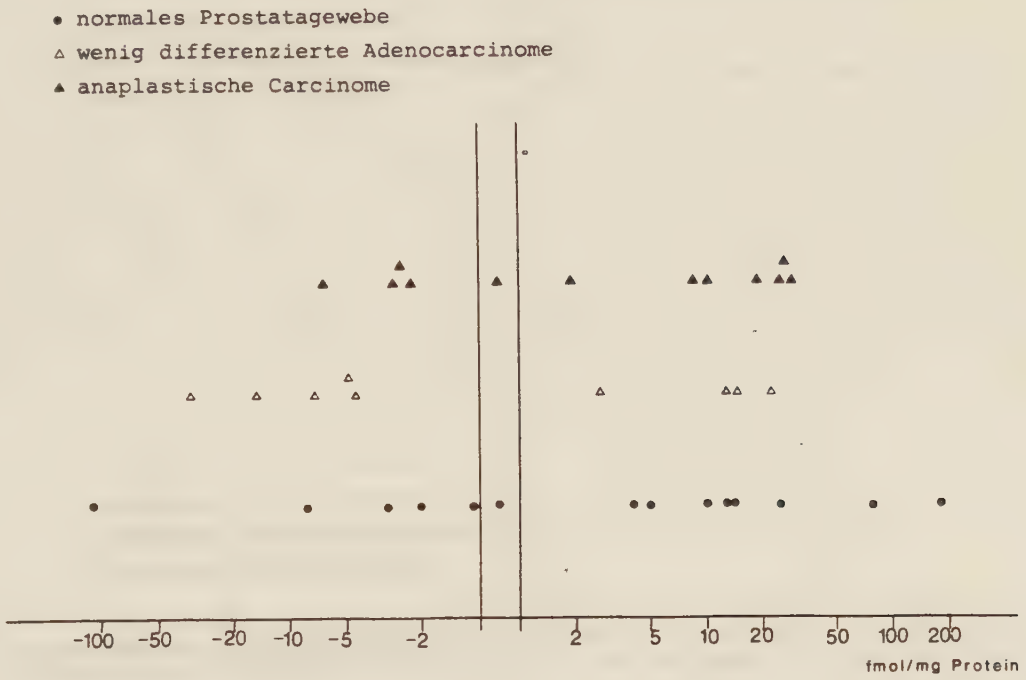


Abb. 6: Konzentration der Progesteronrezeptoren in fmol/mg DNA in normalem Prostatagewebe und in Prostatacarcinomgewebe

• normales Prostatagewebe
△ wenig differenzierte Adenocarcinome
▲ anaplastische Carcinome

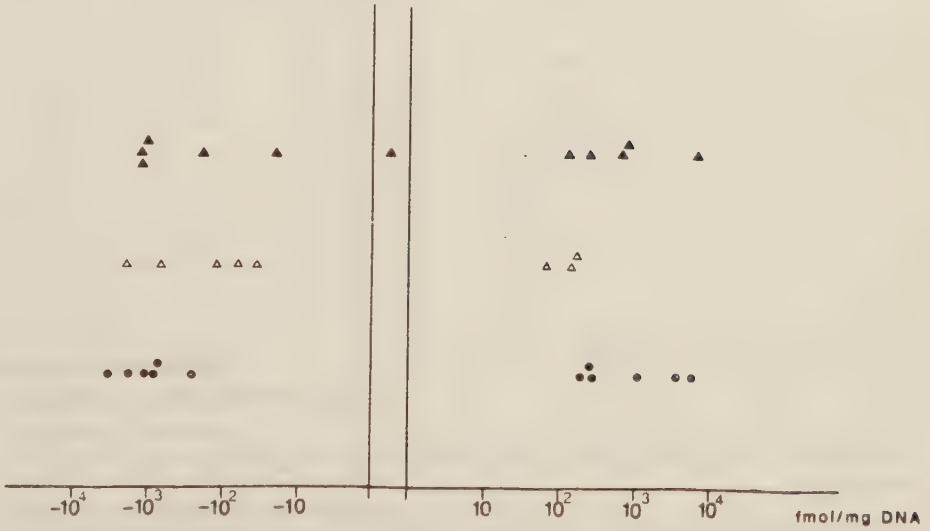


Abb. 7: Konzentration der Progesteronrezeptoren in fmol/mg Protein in normalem Prostatagewebe und in Prostatacarcinomgewebe

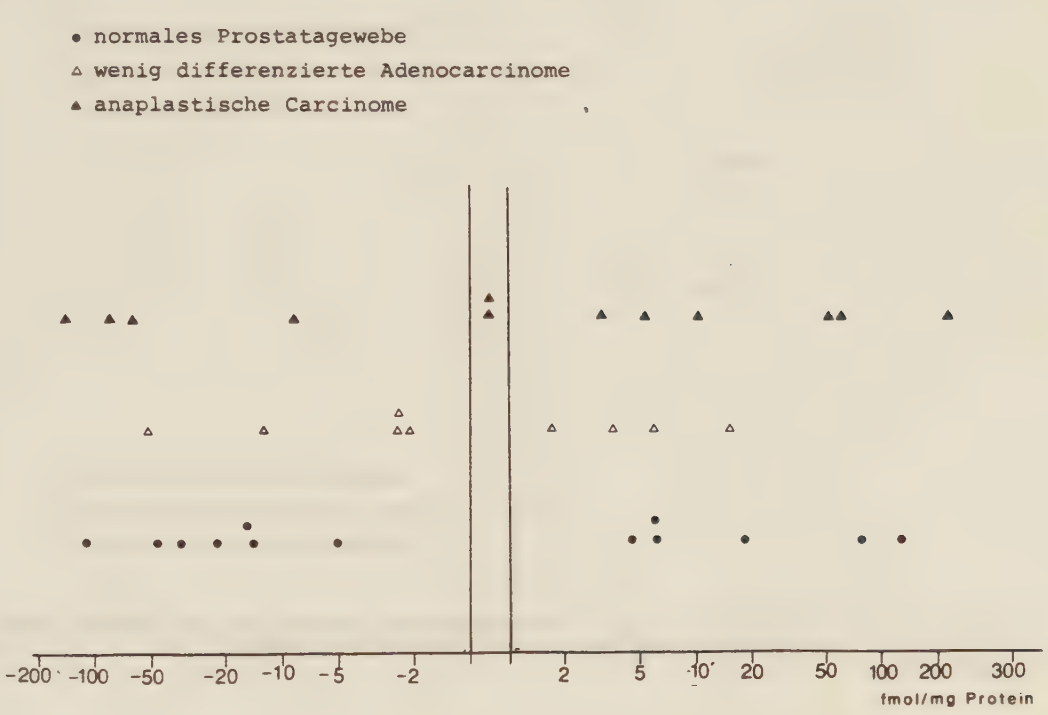


Abb. 8: Konzentration der Östradiolrezeptoren in fmol/mg DNA in normalem Prostatagewebe und in Prostatacarcinomgewebe

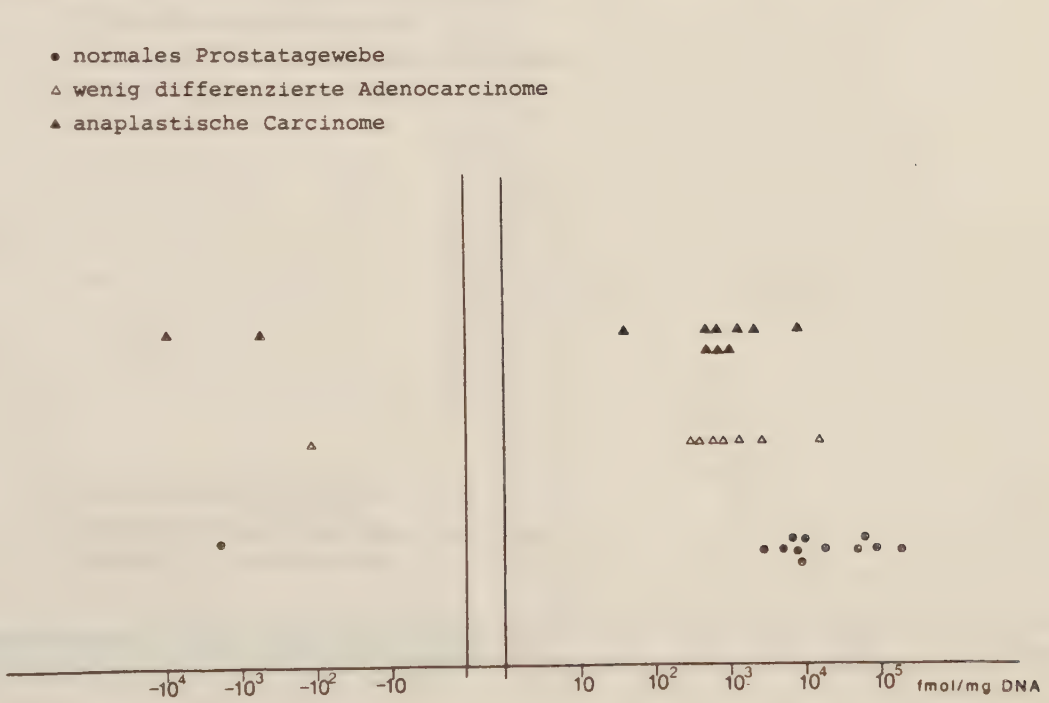
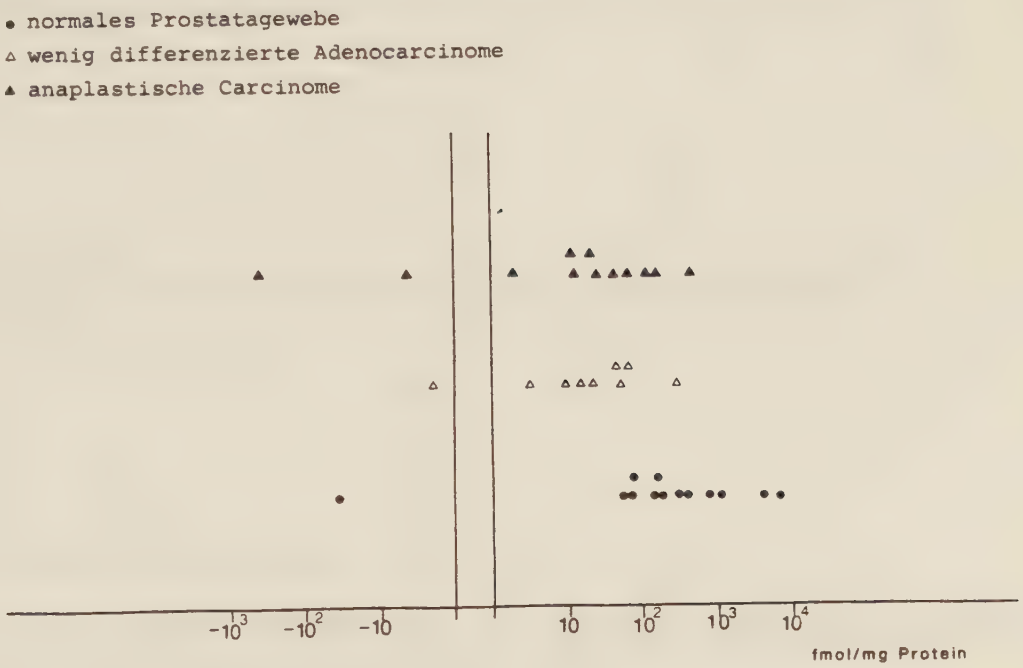


Abb. 9: Konzentration der Östradiolrezeptoren in fmol/mg Protein in normalem Prostatagewebe und in Prostatacarcinomgewebe



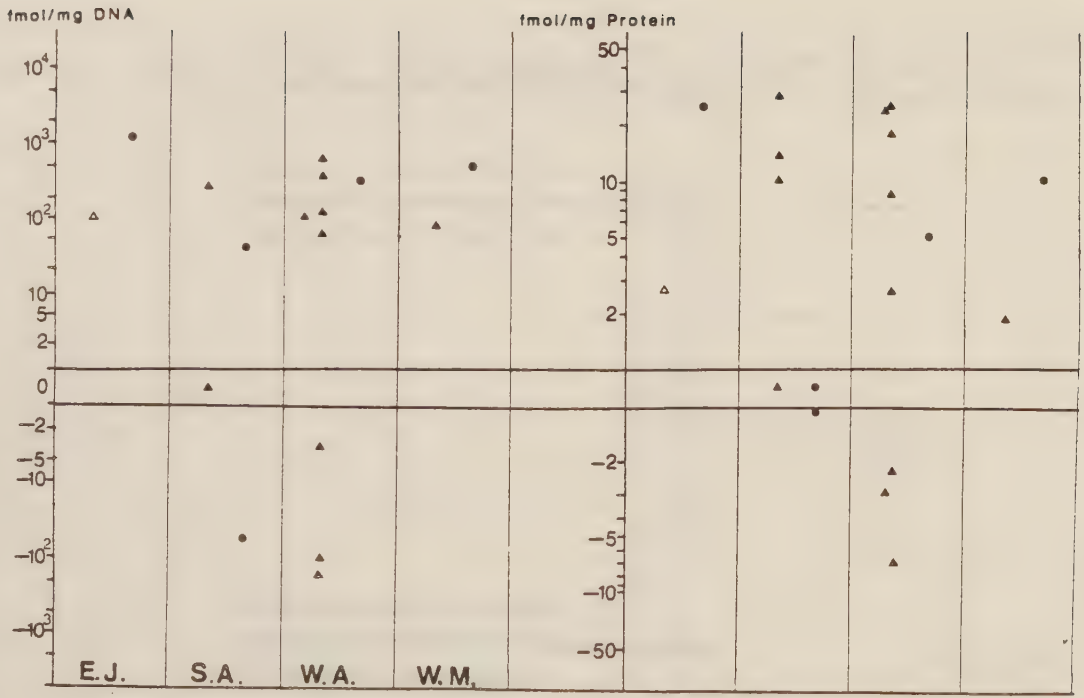


Abb. 10: Konzentration an Dihydrotestosteronrezeptoren im normalen Prostatagewebe und Carcinomgewebe jeweils eines Patienten, links in fmol/mg DNA, rechts in fmol/mg Protein (gleiche Patienten in gleicher Reihenfolge, wie linke Seite)

- • normales Prostatagewebe
- △ Adenocarcinome
- ▲ anaplastische Carcinome

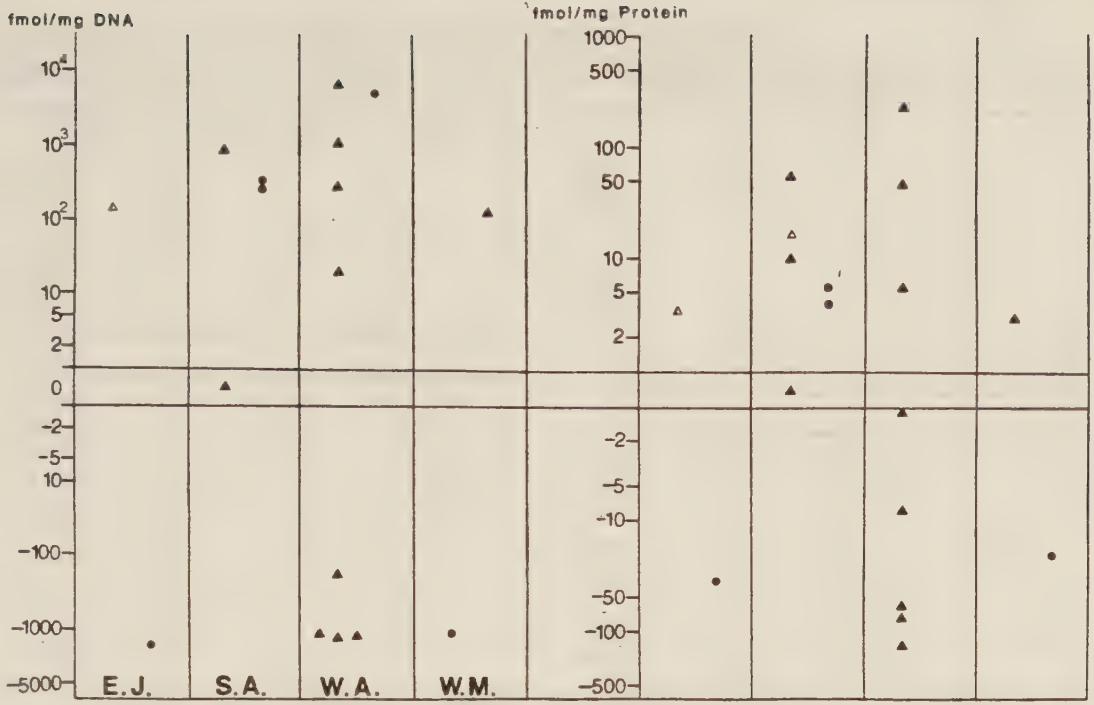


Abb. 11: Konzentration an Progesteronrezeptoren im normalen Prostatagewebe und Carcinomgewebe jeweils eines Patienten, links in fmol/mg DNA, rechts in fmol/mg Protein (gleiche Patienten in gleicher Reihenfolge, wie linke Seite)

• normales Prostatagewebe △ Adenocarcinomgewebe

▲ anaplastische Carcinome

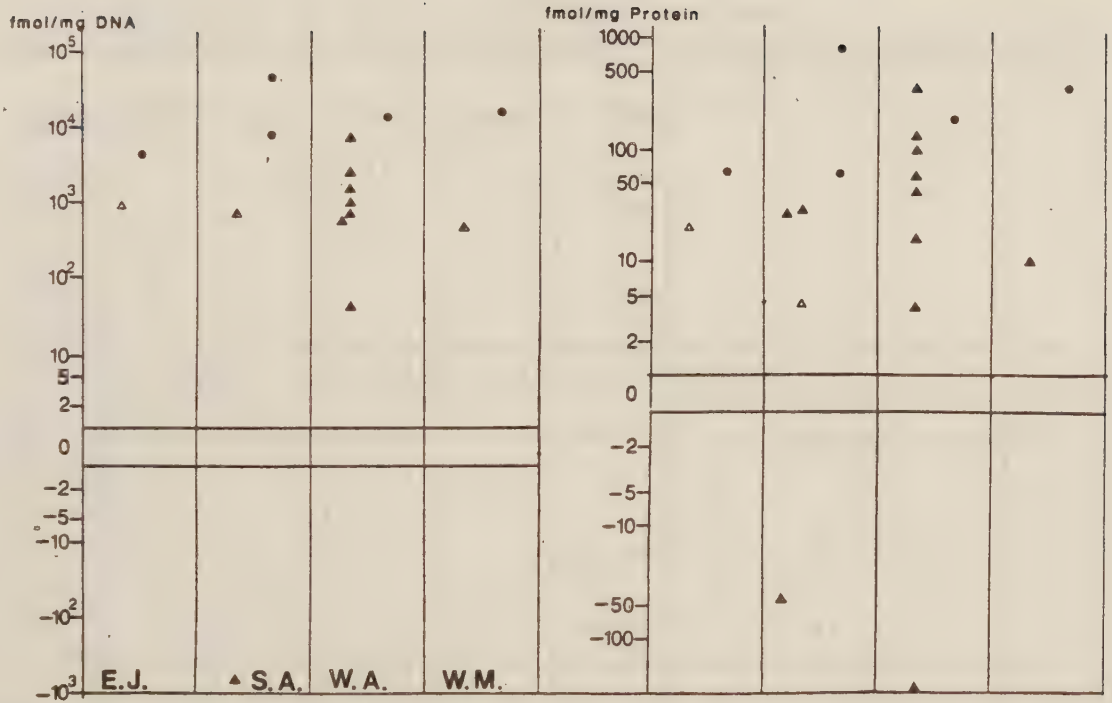


Abb. 12: Konzentration an Östradiolrezeptoren im normalem Prostatagewebe und Carcinomgewebe jeweils eines Patienten, links in fmol/mg DNA, rechts in fmol/mg Protein (gleiche Patienten in gleicher Reihenfolge, wie linke Seite).

• normales Prostatagewebe △ Adenocarcinomgewebe ▲ anaplastische Carcinome

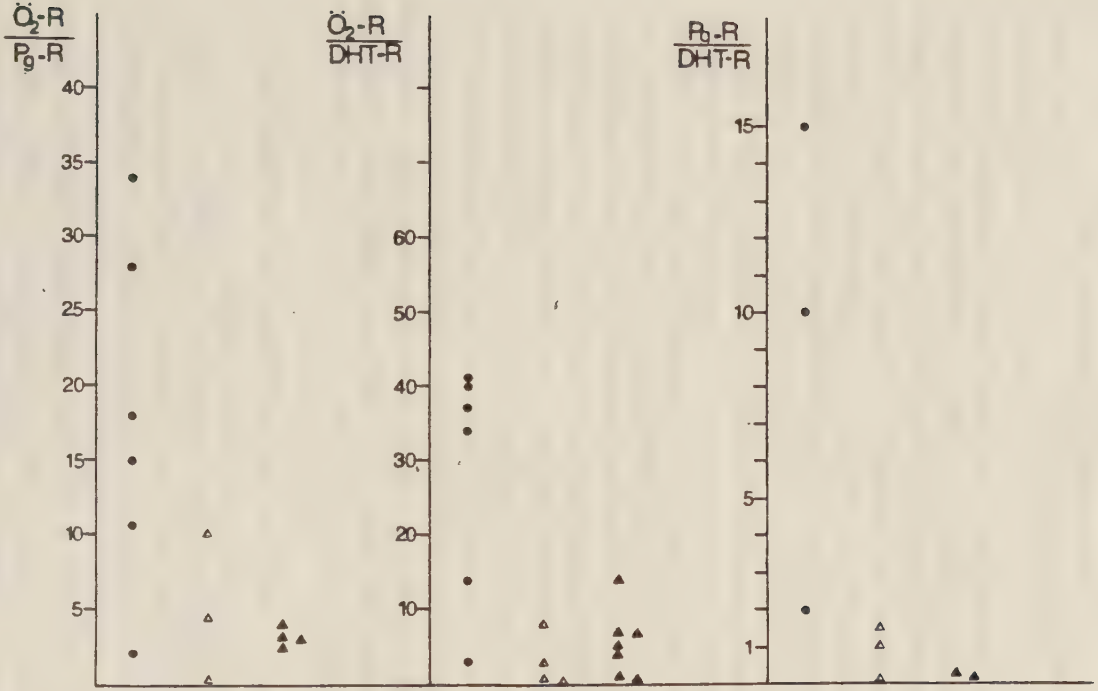


Abb. 13: Verhältnis der Konzentration an Steroidhormonrezeptoren in jeweils einer Gewebeprobe

- • normales Prostatadrüsengewebe
- ▲ anaplastische Carcinome
- Pg-R=Progesteronrezeptor
- △ wenig differenzierte Adenocarcinome
- DHT-R=Dihydrotestosteronrezeptor
- $Ö_2$-R=Östradiolrezeptor

4. DISKUSSION

4.1. Qualität des untersuchten Materials

4.1.1. Wärmebedingte Denaturierung der Rezeptorproteine

Bei der Untersuchung von Prostatacarcinomgewebe auf Steroidhormonrezeptoren stehen Gewebeproben zur Auswahl, die auf ganz unterschiedliche Art und Weise gewonnen werden, nämlich durch Nadelbiopsie, transurethrale Resektion, Kryochirurgie und Entfernung der ganzen Prostata, also Prostatektomie. Von all diesen Gewebeproben müssen die durch transurethrale Resektion gewonnenen als die minderwertigsten angesehen werden, da bei dieser Methode das Gewebe beim Schneiden mit dem Elektrokauter stark erwärmt wird und man deshalb davon ausgehen muß, daß ein erheblicher Teil, der sehr hitzeabilen Rezeptorproteine (SHERMAN 1970, MAINWARING 1969b), bei diesem Vorgehen denaturiert werden und somit nicht mehr nachweisbar sind. Andererseits fällt TUR-Material im klinischen Betrieb in großer Menge an, wogegen wir die Prostata als gesamtes Organ nur in seltenen Fällen zu Untersuchungszwecken bekommen. Biopsiematerial ist von einzelnen Patienten meist nur in so geringer Menge zu erhalten, daß die Durchführbarkeit der quantitativen Rezeptorbestimmung damit nicht mehr gewährleistet ist.

Was nun die Qualität von TUR-Proben und die Wertigkeit der damit erzielten Ergebnisse angeht, so sind die Meinungen darüber sehr kontrovers. Beim Vergleich von TUR- und Ektomiematerial vermögen einige Autoren keinen Unterschied bezüglich des Rezeptorgehaltes festzustellen (SHAIN et al. 1978, DINGJAN 1977), bei anderen Untersuchungen läßt sich hingegen kein Rezeptor mehr nachweisen (SNOWCHOWSKI et al. 1977). GELLER et al. (1975) verwenden TUR-Späne, nachdem diese von verbrannten Gewebsanteilen

gereinigt worden sind mit gutem Erfolg, wieder andere (SIDH et al. 1979) analysieren TUR-Gewebe ohne weiteren Kommentar und kommen ebenfalls zu schlüssigen Resultaten.

Etwas ausführlicher ist das Problem des hitzebedingten Rezeptorverlustes in TUR-Spänen von P.G. DINGJAN (1977) untersucht worden. In dieser Arbeit wird die Breite des mikroskopisch erkennbaren, koagulierten Randsaumes mit durchschnittlich 20 - 70 Mikrometer angegeben. Enzymhistochemische Methoden, die die Aktivität der Enzyme Saure Phosphatase und 5'-Nucleotidase als Indikator für das Ausmaß der Schädigung durch die Hitzeeinwirkung benützen, lassen den Schluß zu, daß durchschnittlich 20 - 100 Mikrometer der Randzone des Spanes beschädigt sind.

Von diesen Daten ausgehend und unter der Annahme, daß der Span zylindrische Gestalt hat, empfiehlt DINGJAN mindestens 100 - 200 mg Gewebe für biochemische Untersuchungen zu verwenden, um nicht mehr als 15 % Rezeptorverlust zu haben. Bedenkt man, daß die wenigsten TUR-Späne Zylindergestalt haben und die Rezeptorproteine vielleicht hitzeempfindlicher sind als die zur Beurteilung herangezogenen Enzyme, so ist dies eine optimistische Einschätzung des Rezeptorverlustes. Jedoch konnte DINGJAN in der Tat keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Östradiolrezeptorgehalts ($Ö_2$-R Gehalt) zwischen einem Ektomiepräparat und den aus dem gleichen Präparat durch Elektroresektion gewonnenen TUR-Spänen feststellen.

OETTLING, G. führte in unserem Labor einen vergleichbaren Versuch aus (FLÜCHTER et al. 1982, noch im Druck). Aus fünf Adenomen wurden durch TUR vor transvesikaler Prostataektomie Späne und aus dem Operationspräparat anschließend mit dem Skalpell Scheiben entnommen. Histologisch vergleichbare TUR-Späne enthielten zirka 30 % weniger meßbaren Rezeptor als die Proben aus dem Ektomiepräparat des gleichen Patienten. Die Streuung der Werte überschritt dabei die Präzision der

Methode so sehr, daß Ergebnisse aus TUR-Spänen im Einzelfall noch keinen Schluß auf den Rezeptorgehalt des nativen Gewebes zulassen.

Aus all dem kann man schließen, daß man bei der Verwendung von TUR-Material

1. genügend große Späne verwenden muß (mehr als 100 mg),

2. eine genügende Anzahl von Spänen untersuchen muß, um für das native Gewebe repräsentative Ergebnisse zu erhalten,

3. die Zahl der Bindungsstellen für DHT, R5020 und Östradiol um ungefähr 50 % unterschätzt,

4. mit falsch negativen Ergebnissen rechnen muß.

4.1.2. Auswirkung von Einfrieren und Lagerung auf die Rezeptorproteine

Wir haben unsere Gewebeproben unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei - 70° C maximal 9, im Durchschnitt aber nur 4 Wochen lang aufbewahrt. Es stellt sich dabei die Frage, ob das Einfrieren und die Lagerung der Prostataspäne die Ausbeute an nachweisbaren Hormonrezeptoren wesentlich verringert.

Vielfach wird angegeben, daß sich die Rezeptorproteine durch Zusatz von Glycerin stabilisieren lassen (PHILIBERT und RAYNAUD 1974, HOISAETER 1973). Wir verzichteten auf diese Maßnahme, da andere Autoren zu dem Schluß kommen, daß auch ohne zusätzliche Stabilisatoren der Rezeptorverlust bei - 70° C gering (HOISAETER 1973) oder überhaupt nicht nachweisbar ist (SHAIN et al. 1980).

$Ö_2$-R und Pg-R sollen nach BAACK und GEYER (1980) nach 10 Wochen Aufbewahrung bei - 80° C nur noch mit 50 % bzw. 30 % des Ausgangswertes nachweisbar sein. Diese Angaben erscheinen angesichts der von anderen Autoren (s.o.) gefundenen Werte für den labileren DHT-R als zu pessimistisch. STAIB et al. (1980) empfehlen die Aufbewahrung des lyophilisierten und gefriergetrockneten Untersuchungsmaterials in pulverisierter Form. Bei dem so präparierten Gewebe war selbst nach 100 Tagen Aufbewahrung bei Zimmertemperatur kein meßbarer Verlust an DHT-R, Pg-R oder $Ö_2$-R zu verzeichnen, berichtet STAIB.

Einigkeit herrscht über die Ansicht, daß der hormonbesetzte Rezeptor stabiler ist als der unbesetzte (HOISAETER 1973, BELL und MUNCK 1973). Da auch unser Prostatagewebe von nicht orchidektomierten Patienten stammt, ist auch hier mit einem endogenen DHT-Gehalt von zirka 4 mg/g Gewebe zu rechnen (HAMMOND 1978), der auf das Rezeptorprotein eine stabilisierende Wirkung ausübt.

Wir selbst haben zu der Frage, inwieweit Einfrieren und Lagerung des Gewebes die Rezeptorausbeute mindert, keine gezielten Untersuchungen vorgenommen. Wir konnten in dieser Hinsicht keine augenfälligen Unterschiede zwischen lange gelagerten Geweben und solchen, die kurze Zeit nach der Entnahme von uns analysiert wurden, feststellen. In eingefrorenen und zur Rezeptorbestimmung wieder aufgetauten Cytosolen konnten wir allerdings keine Rezeptoren mehr nachweisen. Unter Berücksichtigung der Meinung anderer Autoren und unserer eigenen Erfahrungen glauben wir annehmen zu dürfen, daß das Einfrieren und Aufbewahren von Prostatagewebe unter den genannten Bedingungen, wenn überhaupt, nur einen Rezeptorverlust nach sich zieht, der 15 % nicht übersteigt.

4.1.3. Homogenität des Gewebes

Es wurde bereits erwähnt (2.4.), daß wir für unsere Versuche nur solche Gewebespäne verwandten, die zu 76 - 100 % Carcinomgewebe enthielten. Man muß mit Recht fragen, inwieweit die histologische Bestimmung zweier Querschnitte aus einem Span für den gesamten Gewebsblock repräsentativ ist.

Angesichts der Tatsache, daß Prostatacarcinome häufig unscharf vom umgebenden Gewebe abgegrenzt sind (HEDINGER, Ch. 1977), ist in den wenigsten Fällen damit zu rechnen, daß sich der in den beiden mikroskopischen Schnitten erhobene Befund in den diesen Querschnitten benachbarten Gebieten abrupt ändert. Die Gefahr, die Histologie eines TUR-Spanes falsch einzuschätzen ist deshalb gering, und Fehlinterpretationen der Versuchsergebnisse dürften bei der von uns gewählten Methode der histologischen Begutachtung die Ausnahme darstellen.

Eine zweite Möglichkeit der histologischen Examination besteht darin, den der Länge nach durchgeschnittenen Span zu beurteilen. Diese Methode bietet dann Vorteile, wenn es sich bei der zu begutachtenden Gewebsprobe um einen langen dünnen Span handelt, weil sich dann das Verhältnis zwischen beurteilbarem Gewebe und den Gewebsanteilen, auf die man rückschließen muß, gegenüber dem oben beschriebenen Verfahren verbessert. Dieser Vorteil schwindet aber, je mehr sich der Span der Kugelform nähert. Da die Form von TUR-Spänen bekanntlich sehr variabel ist, läßt sich sowohl die Wahl der ersten wie auch der zweiten Methode begründen, ohne daß sie sich in ihrer Zuverlässigkeit wesentlich unterscheiden. Aufgrund dieser Erwägungen sind wir der Meinung, daß sich mit unserer Methode der histologischen Begutachtung eine ausreichend verläßliche Beurteilung des Gewebes erzielen läßt.

4.2. Inkubation und DHT-Metabolismus

4.2.1. Austausch zwischen endogenem und exogenem Hormon

Bei der quantitativen Bestimmung von Steroidhormonrezeptoren bedarf es einer genauen Definition, ob sich der Rezeptornachweis auf "freie" Rezeptoren, also nicht von endogenen Steroiden besetzte Rezeptormoleküle bezieht, oder auf die Gesamtmenge an Rezeptoren, also die Summe von sowohl freien Rezeptoren, als auch der Rezeptormoleküle, die endogene Steroide gebunden haben. Während sich der freie Rezeptor sehr schnell mit exogen dem Cytosol zugesetzten Hormon zum Hormon-Rezeptorkomplex verbindet, erfolgt der Austausch von endogenem Hormon gegen die zugesetzten Steroide wesentlich langsamer.Beide Reaktionen verlaufen bekanntlich zeit-, konzentrations- und temperaturabhängig. Von diesen drei Einflußgrößen ist der Temperatur wegen der Thermolabilität des Rezeptors eine sehr enge Grenze gesetzt. Die Inkubation erfolgt im allgemeinen bei 0 - 4° C. Die Steroidkonzentration ist, um zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung differenzieren zu können, nur in einem sehr engen Rahmen variabel. Allein die Inkubationsdauer erlaubt größere Abweichungen. Man geht dabei von der Vorstellung aus, daß bei kurzer Inkubationsdauer (1 - 2 h) überwiegend die schnell sättigbaren freien Rezeptoren gemessen werden, während durch längere Inkubationszeiten auch ein bestimmter Teil der besetzten Rezeptoren erfaßt wird (MOELLER et al. 1980). Zwar geben MILGROM et al. (1972) an, daß bereits nach 2,5 Stunden 92 % des endogenen Progesterons gegen ^{3}H-Progesteron ausgetauscht seien. Dieses im Tierversuch erhobene Ergebnis steht aber in krassem Widerspruch zu den von GUSTAFFSON et al. (1978) angegebenen Werten bei menschlichem Prostatagewebe, wo noch nach 16 Stunden Inkubation eine geringe Zunahme der spezifischen R5020-Bindung beobachtet werden konnte.

4.2.2. Vor- und Nachteile der Langzeitinkubation

Man sollte die Inkubationsdauer aber nicht über 24 - 48 Stunden ausdehnen, da auch der besetzte DHT-Rezeptor selbst bei niedrigen Temperaturen einer gewissen Degradation unterliegt (OETTLING, Dissertation Tübingen in Vorbereitung). Daneben unterliegen die zur Markierung verwandten Steroide einem enzymatischen Abbau (s. 4.2.4.), so daß ab einer gewissen Inkubationsdauer die durch längere Inkubation zu erzielende Rezeptorausbeute durch die genannten Störeffekte zunichte gemacht wird. Die von uns gewählte Inkubationszeit von ca. 22 Stunden Dauer wird auch von einer großen Zahl von Forschergruppen (De VOOGT et al., DINGJAN 1978, KRIEG et al. 1978, HICKS u. WALSH 1979, GUSTAFFSON et al. 1978, EKMAN 1979, ASSELIN 1976) als guter Kompromiß angegeben zwischen hoher Rezeptorausbeute durch lange Inkubation einerseits und andererseits den damit zwangsläufig verbundenen Störeffekten, durch die das Meßergebnis verfälscht und unsicher wird.

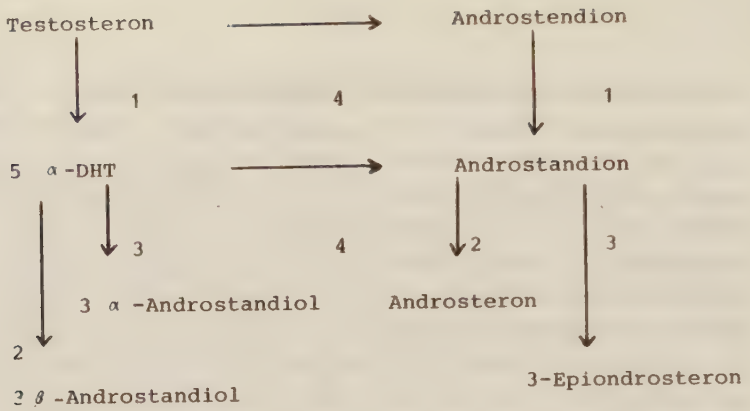
4.2.3. Mengenmäßiger Anteil des endogenen DHT im Inkubationsansatz

Bei der Konzeption der Inkubationsansätze ist es erforderlich, die Konzentration von endogenen, also im Gewebe natürlicherweise vorhandenen Steroidhormonen, als möglichen Störfaktor in Betracht zu ziehen. Im Tierversuch ermittelte Werte (GHANADIAN et al. 1975) ergaben bei jungen und alten Ratten ungefähr die gleichen Plasma-DHT Spiegel (20 ng/100 ml). Der DHT-Gehalt im Prostatagewebe von erwachsenen Ratten wird von CORPÉCHOT et al.(1981) mit durchschnittlich 10 ng/g Gewebe angegeben. Diese Konzentration würde umgerechnet auf die unseren Inkubationsansätzen zugrunde liegenden Konzentrationen hier zirka 2,3 % der Gesamtmenge an DHT im heißen Ansatz entsprechen. Für die

Verhältnisse bei menschlichem Prostatagewebe sind die Untersuchungen von HAMMOND (1978) aufschlußreich. Demnach ändert sich der DHT- und Progesterongehalt des normalen Prostatagewebes im Laufe des Lebens (1/4 - 75 Jahre) nicht signifikant (1,03 - 1,32 ng DHT/g Gewebe bzw. 0,34 - 0,49 ng Progesteron/g Gewebe). Auffällig ist der erhöhte DHT-Gehalt beim Prostatacarcinom (4,1 ng/g Gewebe). Bezogen auf die Gesamtmenge an DHT im heißen Ansatz entfielen hier auf das endogene DHT zirka 10 %. Man muß hinzufügen, daß in der zitierten Arbeit nur ein Carcinom untersucht wurde und der angegebene Wert deshalb nicht repräsentativ sein muß. Bedenkt man aber die Tatsache, daß ein großer Anteil der endogenen Steroide offenbar im Zellkern anzutreffen ist (ANDERSON u. LIAO 1968, HICKS u. WALSH 1979, BRUCHOVSKY u. WILSON 1968a) so kann man davon ausgehen, daß der Anteil der endogenen Steroide einen so geringen Teil der Gesamtsteroidkonzentration in den Inkubationsansätzen ausmacht, daß die Rezeptorbestimmung im Cytosol dadurch nicht beeinträchtigt wird.

4.2.4. DHT-Metabolismus

Wählt man zur Bestimmung des DHT-Rezeptors die Langzeitinkubation (22 h) so entsteht neben dem Rezeptorverlust wegen dessen kurzer Halbwertszeit noch ein zweites Problem, nämlich der Abbau von DHT zu Stoffwechselprodukten, die keine Affinität mehr zum Rezeptor besitzen. Die entscheidenden Stoffwechselvorgänge gibt das folgende Schema von VERHOEVEN (1971), modifiziert nach KRIEG u. VOIGT (1977) wider (s. Seite 42).



1 = Δ^4-3-Ketosteroid-5 α-Reduktase,

2 = 3 α -Hydroxysteroidoxidoreduktase,

3 = 3β-Hydroxysteroid-Oxidoreduktase

4 = 17β-Hydroxy-C_{19}-steroid-oxidoreduktase

Die meisten Autoren glauben, daß die Unterdrückung des DHT-Stoffwechsels ausreichend gewährleistet ist, wenn die Inkubation bei 0 - 4° C vorgenommen wird. In der Tat aber ist die Konversion von DHT zu seinen Hauptabbauprodukten Androstandiol, Androstandion und Androsteron im Tierversuch (Rattenprostata) auch unter diesen Bedingungen noch sehr ausgeprägt, so daß am Ende der Inkubation nurmehr zirka 60 - 80 % des eingesetzten DHT noch in seiner ursprünglichen Form vorhanden ist (PLASSÉ et al. 1977, BRUCHOVSKY u. WILSON 1968b, BAULIEU et al. 1970). Bei unseren Versuchen mit menschlichem Gewebe beobachteten wir bisweilen das Auftreten von negativen Werten bei der quantitativen Bestimmung der Rezeptorkonzentration. Die Erklärung dafür ist, daß in Ansatz 1 das heiße DHT zum großen Teil metabolisiert wurde, während in Ansatz 2 neben dem ^{3}H-DHT auch noch das nicht radioaktive DHT in hundertfachem Überschuß zum Abbau zur Verfügung steht. Damit wird in Ansatz 2 nur der hundertste Teil an ^{3}H-DHT (nicht Gesamtmenge DHT) metabolisiert als in Ansatz 1, wo nur ^{3}H-DHT abgebaut werden kann.

Damit steht in Ansatz 1 weniger radioaktives DHT zur Markierung der Rezeptoren und der unspezifisch bindenden Proteine zur Verfügung als in Ansatz 2. So kommt es dazu, daß in manchen Fällen die Differenz $\Delta = A_1 - A_2$ unterschätzt wird oder negative Werte annehmen kann.

Dadurch, daß wir zur Supprimierung der spezifischen Bindung in Ansatz 2 das synthetische, nicht metabolisierbare R1881 statt DHT einsetzten, ist nun in beiden Ansätzen die gleiche Gesamtmenge an DHT vorhanden, so daß in A_1 wie A_2 die gleiche Menge ^{3}H-DHT abgebaut wird.
Dennoch stellt der DHT-Metabolismus eine große Quelle der Unsicherheit bei der quantitativen DHT-Rezeptorenbestimmung dar.

4.2.5. Anwendung des Enzyms NADase zur Unterdrückung des DHT-Metabolismus

Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß die Hydroxysteroidoxidoreduktasen, die den Abbau von DHT zu Androstandiol, Androstandion und Androsteron bewerkstelligen, NADPH als Coenzym benötigen (NOZU u. TAMAOKI 1975) inaugurierten MOELLER et al. (1980) eine Methode zur Unterdrückung dieses Stoffwechselweges. Sie basiert darauf, das Coenzym NADPH durch Anwendung des Enzyms NADase zu zerstören. Damit ist den DHT abbauenden Enzymen der notwendige Cofaktor entzogen und der Metabolismus von DHT unmöglich. Je nach Konzentration der NADase wird der DHT Stoffwechsel in unterschiedlichem Ausmaß gehemmt; wir erreichen mit der von uns verwandten NADase Konzentration eine Suppression des DHT-Metabolismus von 80 %, was ausreichend genaue Ergebnisse erwarten läßt.

4.3. Wahl der Liganden

4.3.1. Einleitung: radioaktive und synthetische Liganden

Die Erforschung von Steroidhormonrezeptoren hat ihren ersten, wesentlichen Impuls durch die Darstellung des mit Tritum markierten ^{3}H-Östradiol erhalten (JENSEN u. JACOBSEN 1962). Im Laufe der Zeit konzentrierten sich die Bemühungen auf die Entwicklung synthetischer Steroidhormone, wie Methyltrienolon R1881 (VELLUZ et al. 1963), Promegeston R5020 (JOLY et al. 1963) und Moxestrol R2858 (AZADIAN-BOULANGER u. BERTIN 1973). Diese synthetischen Steroide haben gegenüber ihren natürlichen Vorgängern DHT, Progesteron und Östradiol drei entscheidende Vorteile. Methyltrienolon soll eine höhere Affinität zum DHT-R haben als DHT selbst, während seine Affinität zum SHBG ungefähr 500 mal geringer ist als die des natürlichen Liganden. Darüberhinaus wird Methyltrienolon im Gegensatz zu DHT nicht metabolisiert (BONNE u. RAYNAUD 1975). Die verbesserten Eigenschaften des Methyltrienolon wurden inzwischen von mehreren Autoren untersucht.

4.3.2. Affinität des Methyltrienolon, R1881, zum DHT-Rezeptor

Eine höhere Affinität des R1881 im Vergleich zu DHT wird von COWAN et al. (1977), SHAIN et al. (1980), ASSELIN et al. (1976) und SNOWCHOWSKI et al. (1977) bestätigt, während KRIEG et al. (1978) DHT und R1881 als gleichwertig ansehen. Wahrscheinlich aber ist die höhere Affinität des R1881 zum DHT-R nur ein Artefakt. Keiner der zitierten Autoren berücksichtigte bei seinen Versuchen den Metabolismus von DHT (s. 4.2.4.). Neueste Ergebnisse von FIEDERER, B. (Dissertation Tübingen, in Vorbereitung)

sprechen dafür, daß die scheinbar niedrigere Affinität für DHT tatsächlich auf die Abnahme der DHT-Konzentration während der Inkubation zurückzuführen ist. Nach Unterdrückung des DHT-Stoffwechsels mit NADase ergaben sich bei der Affinitätsbestimmung für R1881 und DHT ähnliche Werte, wobei DHT eine signifikant höhere Affinität zum DHT-R aufweist als R1881: K_D(DHT)=0,405 $\pm$ 0,084 nM; K_D(R1881)=1,25 $\pm$ 0,271 nM.

4.3.3. Spezifität von Methyltrienolon

Im Zusammenhang mit dem DHT-Metabolismus müssen auch die von verschiedenen Autoren geäußerten Zweifel an der Spezifität der R1881-Bindung gesehen werden. Namentlich bei der Untersuchung menschlicher Gewebe (BPH, Myometrium) sah man, daß sich die spezifische Bindung von Methyltrienolon durch Progesteron bzw. R5020 stärker supprimieren ließ als durch DHT und umgekehrt, daß die Bindung von R5020 durch R1881 hemmbar ist (ASSELIN et al. 1976, MENON et al. 1978, HICKS u. WALSH 1979). Aufgrund der oben gemachten Überlegungen über die Unterschätzung der DHT-Affinität unter ungeeigneten experimentellen Bedingungen, sind Bindungsstudien, die DHT als einen schlechten Kompetitor für R1881 aufweisen kein Beweis für die Annahme, R1881 würde an einen atypischen DHT-Rezeptor oder eine bisher unbekannte rezeptorartige Komponente des Cytosols binden. Dagegen ist die Tatsache, daß R5020 in einigen Fällen ein guter Kompetitor für R1881 ist, ein Hinweis dafür, daß die Bindung von R1881 im Cytosol von Prostata, Samenblase und Nebenhoden einige Merkmale der Bindung an einen progesteronartigen Rezeptor aufweist (MENON et al. 1978).

Um diese Unsicherheit im Bindungsverhalten des R1881 auszuschließen, haben wir uns für das DHT als Liganden entschieden. Seine hohe Spezifität für Androgenrezeptoren wurde von ANDERSON u. LIAO (1968), MAINWARING (1969) und FANG u. LIAO (1969) nachgewiesen und ist der des Methyltrienolon wahrscheinlich überlegen (FIEDERER, Dissertation Tübingen, in Vorbereitung). Die Nachteile von DHT, wie Bindung an SHBG

und Metabolismus zu Androstandiol, glauben wir durch die Agargelelektrophorese als Trennungsverfahren einerseits und die Anwendung von NADase andererseits aufheben zu können. Die Gründe für unseren Entschluß, R1881 als Kompetitor der ^{3}H-DHT-Bindung einzusetzen, wurden bereits an anderer Stelle erläutert (s. 4.2.4.).

Wenn sich nun R1881 im menschlichen Gewebe an andere als DHT-Rezeptoren bindet, so stellt sich die Frage, ob es überhaupt zulässig ist, diese Substanz als Kompetitor für eine ^{3}H-DHT-Bindung zu verwenden. Unter der Annahme, daß sich R1881 auch an den Pg-R bindet, ist ein Vergleich der relativen Bindungsaffinitäten von R1881, R5020 und DHT zweckmäßig, um sich eine Vorstellung vom Ausmaß dieser "falschen" Bindung machen zu können. Unter relativer Bindungsaffinität versteht man die Menge eines Liganden A, die 50 % eines gebundenen Liganden B aus seiner Bindung verdrängt, im Verhältnis zu der Menge an Ligand B die für den gleichen Effekt nötig wäre, also $^{B}/_{A}$ = rel. Affinität von A.

Tabelle II: Vergleich der relativen Bindungsaffinitäten von R1881, R5020 und DHT

	R1881/R1881	DHT/R1881	R5020/R1881
Prostata-CA (SHAIN et al. 1980)	1,0	0,66	0,038
BPH und Prostata-CA (SNOCHOWSKI et al. 1977)	1,0	0,48	0,02
BPH (SHAIN et al. 1978)	1,0	0,57	0,14
BPH (COWAN et al. 1977)	1,0	0,08	0,22
BPH (MENON et al. 1978)	1,0	0,02	0,21

Aus dieser Aufstellung geht hervor, daß sich R1881 in BPH-Gewebe in der Tat auch an progesteronartige Rezeptoren bindet, denn R5020 vermag bei gleicher Konzentration immerhin ungefähr ein Fünftel des gebundenen R1881 aus einer Bindung zu verdrängen (COWAN et al. 1977, MENON et al. 1978). Dieser Effekt scheint bei Carcinomgewebe nicht so ausgeprägt zu sein (SHAIN et al. 1980). Dagegen finden SNOWCHOWSKI et al. (1977) keinen Unterschied in der Qualität der R1881-Bindung zwischen BPH und Prostatacarcinom. Die Annahme, daß trotz der Bindung des Methyltrienolon an andere, als DHT-Rezeptoren, noch genügend R1881 als Kompetitor zur Verfügung steht ist also berechtigt. Bei BPH-Proben jedoch ist gegenüber R1881 als Kompetitor für DHT Zurückhaltung angebracht.

4.3.4. Eigenschaften von Promegeston, R5020

Unsere Entscheidung, statt Progesteron das synthetische Promegeston R5020 für die Bestimmung des Pg-R zu benutzen, hat ihren hauptsächlichen Grund darin, daß R5020 im Gegensatz zu Progesteron keine Bindung mit dem Cortisol bindenden Globulin CBG eingeht. Die Affinität von Promegeston zum Glucocorticoidrezeptor ist wesentlich geringer, als die des Progesterons. So berichtet RAYNAUD (1977), daß sich durch R5020 zirka 10 % der Dexamethasonbindung in Cytosol der Rattenleber supprimieren lassen. Darüberhinaus hat Promegeston eine höhere Affinität zum Pg-R als der natürliche Ligand (Philibert u. RAYNAUD 1974, RAYNAUD 1977). Ein weiterer Vorteil von R5020 ist die von WAGNER (1978b) beschriebene Tatsache, daß die Dissoziation des R5020-Pg-R Komplexes während der Elektrophorese nur 2 % pro Stunde Laufzeit beträgt, im Gegensatz zu 25 - 27 % Dissoziation bei der Verwendung von Progesteron. R5020 wird ebenso wie Methyltrienolon nicht metabolisiert. Dies ist jedoch nur ein geringer Vorteil, da der Stoffwechsel von Progesteron während der Inkubation ohnehin nur gering ist (YOUNG u.

CLEARY 1974, MILGROM et al. 1972, WISER et al. 1978). Die gegenüber dem Progesteron verbesserten Eigenschaften von Promegeston sind der Grund dafür, daß heute für den Nachweis von Pg-R fast ausschließlich R5020 verwendet wird.

Dennoch ist der Einsatz dieses synthetischen Steroids nicht ohne Kritik geblieben. Bei der Anwendung von R5020 zur Bestimmung des Pg-R in BPH-Cytosolen kommen COWAN et al. (1977) zu dem Schluß, daß R1881 und R5020 hier zum Teil die gleichen Bindungsstellen besetzen. Es ist nicht sicher, ob es sich dabei um den DHT-R handelt oder ob sowohl R1881 und R5020 Liganden für einen unspezifischen, progestinbindenden Rezeptor sind. Jedenfalls ist damit die Spezifität der Bindung von Promegeston in Frage gestellt. Allerdings ist bislang noch ungeklärt, ob die bei BPH-Cytosolen gefundenen Ergebnisse sich ohne Modifikation auch auf Prostatacarcinomgewebe übertragen lassen. Unter Berücksichtigung der in Tabelle II zusammengefaßten Ergebnisse scheint dies nicht der Fall zu sein. Man kann also davon ausgehen, daß die Kreuzreaktion von R1881 und R5020 mit bisher nicht näher identifizierten Rezeptoren ein für BPH-Cytosole spezifisches Problem darstellt.

Die Arbeit von SHAIN et al. (1978) gipfelt in der Feststellung, daß sich mit R5020 nur unbesetzte Pg-R markieren lassen, nicht aber solche, die mit endogenem Progesteron besetzt sind. Dabei wurde zur Bestimmung des freien Pg-R 2 Stunden lang bei 0° C mit R5020 inkubiert, zur Bestimmung von freiem und besetztem Rezeptor 24 Stunden lang bei 15° C. Während nach der Langzeitinkubation fünfmal mehr R1881 Bindungsstellen nachgewiesen werden konnten als nach zweistündiger Inkubation, war der Pg-R nach der Langzeitinkubation nicht mehr nachweisbar. Unsere eigenen Erfahrungen lehren, daß eine 24 stündige Inkubation bei 15° C in der Tat dazu führt, daß infolge der Thermo-

labilität des Rezeptors kein Pg-R mehr nachweisbar ist. Dies muß auch bei den Versuchen von SHAIN der Fall gewesen sein, da nach 24-stündiger Inkubation nicht einmal die zuvor bestimmten, freien Rezeptoren gefunden wurden. Die Untersuchungen von SHAIN sind unseres Wissens bisher nicht von anderer Seite bestätigt worden. Wir glauben deshalb, daß unter unseren Inkubationsbedingungen (22 Stunden bei 4^{o} C) durchaus ein Austausch von endogenem Progesteron mit R5020 stattfindet und die gemessenen Werte freie und besetzte Rezeptoren darstellen. Diese Annahme wird auch durch die Arbeit von GUSTAFFSON et al. (1978) bestätigt, der bei der Inkubation von BPH-Cytosolen mit ^{3}H-R5020 bei 0^{o} C bis zu 16 Stunden lang eine Zunahme der spezifischen Bindung beobachtete.

4.3.5. Eigenschaften von Östradiol

Der Nachweis des $Ö_2$-R gelingt ohne Nachteile mit dem natürlichen Liganden Östradiol. Zwar steht ein entsprechendes synthetisches Steroid, das Moxestrol, R2858 zur Verfügung, jedoch ist der Metabolismus des Östradiol so gering (JENSEN u. JACOBSON 1962), daß damit kein Grund für den Einsatz eines nicht metabolisierbaren, synthetischen Produkts vorliegt. Das Ausmaß der Bindung von Östradiol an SHBG ist um den Faktor 2 - 3 geringer als bei DHT (ROSNER u. SMITH 1975, TRÄGER 1977, CORVOL 1974). Diese Tatsache ist aber von untergeordnetem Interesse, da bei unserem Trennungsverfahren eine vollständige Abtrennung des SHBG möglich ist. Die Dissoziation des Östradiol-$Ö_2$-R Komplexes ist mit 2 % pro Stunde Laufzeit sehr gering (WAGNER 1978). Damit weist der natürliche Ligand Östradiol keine Nachteile auf, die den Einsatz eines synthetischen Steroids mit modifizierten Eigenschaften nötig machen würde.

4.4. Wahl der Separierungsmethode

4.4.1. Eigenschaften spezifisch und unspezifisch bindender Proteine

Die Bestimmung des DHT-R und $Ö_2$-R wird erschwert durch die Anwesenheit von SHBG im Cytosol, welches ebenfalls spezifisch DHT und Östradiol bindet.

k_{ass} DHT-SHBG bei 4^{O} C = $2,4 \times 10^{+9} M^{-1}$

(ROSNER u. SMITH 1975)

k_{ass} $Ö_2$-SHBG bei 4^{O} C = $0,6 \times 10^{+8} - 0,6 \times 10^{+9} M^{-1}$

(ROSNER u. SMITH 1975, WESTPHAL 1971, TRÄGER 1977)

In analoger Weise behindert CBG den Nachweis des Pg-R, da es Progesteron mit einer $k_{ass} = 7 \times 10^{+8} M^{-1}$ spezifisch bindet (WESTPHAL 1971). Daneben besteht noch die weitere Schwierigkeit, die spezifische Bindung an den Rezeptor von der unspezifischen Bindung an andere Proteine, wie zum Beispiel an das Albumin, zu unterscheiden. Jedoch ist die Affinität der Steroide zu diesen unspezifisch bindenden Proteinen um einige Größenordnungen kleiner, als zu den Rezeptormolekülen

k_{ass} Progesteron-Albumin bei 4^{O} C = $3,6 \times 10^{+4} M^{-1}$

(WESTPHAL 1977),

k_{ass} Östradiol-Albumin bei 4^{O} C = $1,6 \times 10^{+5} M^{-1}$

(WESTPHAL 1971).

Allerdings übertrifft die Kapazität der unspezifischen Bindung die Kapazität der Rezeptorbindung um ein Vielfaches.

Dieses Verhältnis ermöglicht es, die spezifische Bindung mit einem Überschuß an nicht radioaktivem Hormon zu supprimieren, ohne daß dadurch die unspezifische Bindung wesentlich beeinflußt würde. Diese Methode läßt sich aber zur Unterscheidung der Bindung von Steroiden an SHBG bzw. Rezeptoren nicht anwenden, da sowohl die Steroidrezeptoren als auch SHBG Steroidhormone mit vergleichbarer Affinität binden.

4.4.2. Übersicht über die gebräuchlichsten Separierungsmethoden

Um eine ausreichende Trennung zwischen SHBG bzw. CBG und den Rezeptormolekülen zu gewährleisten, kommen zahlreiche Verfahren zur Anwendung. Die Trennung der Moleküle erfolgt hierbei unter Ausnutzung ihrer unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften. Als die bekanntesten Separierungsmethoden seien genannt die Sucrosedichtegradientenzentrifugation, die Säulenchromatographie und die Agargelelektrophorese. Eine Übersicht darüber, was diese Methoden leisten und über die mit ihrer Hilfe erzielten Ergebnisse finden sich bei JUNGBLUT et al. (1972), MENON et al. (1977) und MOELLER (1981). Dabei kommen JUNGBLUT et al. (1972) zu dem Schluß, daß die Agargelelektrophorese und die Säulenchromatographie mit Sephadex G25 für die Steroidhormonrezeptorenbestimmung die geeignetsten Methoden seien. Dagegen berichten GELLER et al. (1975), es sei nicht möglich mit Hilfe des Säulenchromatographie einwandfrei zwischen SHBG und dem Androgenrezeptor zu unterscheiden. Allerdings wurde in den zu Grunde liegenden Versuchen statt Sephadex G25 wie bei JUNGBLUT et al., Sephadex G50 verwandt.

4.4.3. Anwendungsgebiete und Grenzen des "Charcoal assay"

Das am häufigsten angewandte Verfahren zum Nachweis der spezifischen Rezeptorbindung ist der Charcoal assay (MILGROM u. BAULIEU 1969). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der unterschiedlich schnellen Adsorption von freien bzw. gebundenen Steroiden an Aktivkohle. Dabei werden die freien Steroide am schnellsten, die unspezifisch gebundenen Steroide langsamer und die spezifisch gebundenen noch langsamer adsorbiert. Der Adsorptionsvorgang ist abhängig von der Proteinkonzentration im Cytosol, der Konzentration der zugegebenen Aktivkohle, der Einwirkungszeit und der Konzentration an freiem Hormon im Inkubat (BINOUX u. ODELL 1973). Die erforderliche Konstanthaltung der Inkubationsbedingungen (BINOUX u. ODELL 1973, De HERTOGH 1975) ist schwierig, da die Proteinkonzentration und das Verhältnis von freiem zu gebundenem Hormon im Einzelfall nicht vorausgesagt werden kann. Bricht man den Adsorptionsvorgang zu früh ab, so erhält man zu hohe Werte für die spezifische Bindung, weil ein Teil der unspezifischen Bindung fälschlicherweise dazu gerechnet wird. Bricht man die Adsorption zu spät ab, so erhält man zu niedrige Werte, da bereits schon ein Teil der spezifisch gebundenen Steroide adsorbiert wurde.

Mit dem Charcoal assay allein ist eine Unterscheidung zwischen SHBG und Rezeptorproteinen nicht möglich. Deshalb müssen entweder synthetische Liganden mit geringer Affinität zu SHBG verwendet werden oder man muß SHBG vor oder nach der Inkubation abtrennen. In diesem Zusammenhang berichten SHAIN et al. (1975b), daß der Charcoal assay, auf unfraktionierte Cytosole angewandt, nicht erfolgreich ist.

Nach MILGROM et al. (1972) verbietet die Labilität des Pg-R eine Anwendung von Aktivkohle zu dessen Bestimmung. Diese für den Pg-R getroffene Feststellung hat vermutlich auch für den DHT-R und den $Ö_2$-R Gültigkeit.

4.4.4. Vorteile der Agargelelektrophorese

Von allen oben genannten Separierungsmethoden ist bisher allein die Agargelelektrophorese ohne Widerspruch geblieben. Zumindest sind uns keine anderslautenden Veröffentlichungen bekannt. Seit der Einführung dieses Trennungsverfahrens durch WAGNER, R.K. (1972), hat diese Methode zahlreiche Nachahmer gefunden, die mit ihrer Hilfe zu schlüssigen Ergebnissen kommen (ROSEN et al. 1975, CONCOLINO et al. 1977, KRIEG et al. 1978, KUMMER 1980, MOELLER et al. 1980, MOELLER 1981).
Der entscheidende Vorteil bei der Elektrophorese ist die unterschiedliche Laufrichtung der Rezeptormoleküle, die bei pH 8,2 negativ geladen sind und zur Anode streben, und des β-Globulins SHBG, welches sich kathodenwärts bewegt (WAGNER 1972, 1978, CORVOL 1974). CBG, ein α-Globulin wandert wie die Rezeptorproteine zur Anode. Ein Nachteil, den wir aber durch die Anwendung des synthetischen Progestinliganden R5020 ausgleichen konnten (s. 4.3.4.).

4.4.5. Dissoziationsvorgänge während der Agargelelektrophorese

Während der zweistündigen Elektrophorese kommt es zum Abdissoziieren von spezifisch und unspezifisch gebundenen Steroidhormonen. Wenngleich dies bei den unspezifisch bindenden Proteinen, wie zum Beispiel Albumin durchaus erwünscht ist, vermindert ein solcher Dissoziationsvorgang andererseits auch die Ausbeute an spezifischer Bindung. Nach zwei Stunden Elektrophorese sind die Steroidhormone vom Albumin fast vollständig abdissoziiert (JUNGBLUT et al. 1972, CORVOL 1974, WAGNER 1978b). Die Dissoziationsrate für den SHBG-DHT Komplex beträgt pro Stunde Laufzeit 17 %, beim rezeptorgebundenen DHT 25 - 27 % pro Stunde. Die Dissoziationsrate des rezeptorgebundenen R5020 und Östradiol ist mit je 2 % pro Stunde Laufzeit

gering (WAGNER 1978b). Die durch Dissoziation freigesetzten Steroide werden dabei durch den im Agargel herrschenden endosmotischen Fluß in Richtung der Kathode transportiert. Dabei können sie sich im anodischen Teil der Platte wieder an Proteine binden und erneut abdissoziieren. Das ist die Erklärung dafür, daß die Dissoziationskurven nicht einer e-Funktion folgen, wie man erwarten sollte, sondern linear verlaufen (WAGNER 1978b). Weiterhin wird dadurch klar, warum die Radioaktivität zwischen den einzelnen Peaks nicht auf Null absinkt, sondern stets einen, durch freies Hormon verursachten unspezifischen Hintergrund bildet (CORVOL 1974). Diese Vorgänge spielen sich während der Elektrophorese von Ansatz 1 und Ansatz 2 in gleicher Weise ab. Nach der Subtraktion $A_1 - A_2$ zur Errechnung der spezifischen Bindung, hebt sich die Hintergrundsaktivität beider Ansätze auf. Kleine zufällige Fehler können allerdings, bei sehr großer Hintergrundsaktivität, eine große Auswirkung auf die Berechnung der spezifischen Bindung haben (näheres s. 4.7.2.).

4.4.6. Probleme bei der Agargelelektrophorese

In den Fällen, in denen wir startlochnahe Peaks für Ansatz 1 und 2 fanden, die sich, wie oben beschrieben bei der Auswertung aufgehoben haben, vermuten wir, daß es hier durch die Unterbrechung der Kontinuität der Gelplatte durch das Startloch zu einer teilweisen Unterbrechung des endosmotischen Flusses kommt, wodurch sich freie Steroidmoleküle in ihrer Wanderung zur Kathode behindert, hier angehäuft haben.
Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre die Annahme, daß sich während der Inkubation große Proteinkomplexe bilden. Diese wandern dann bei der Elektrophorese wegen ihrer Größe nur äußerst langsam im Agargel, so daß sie sich auch noch nach zwei Stunden in der Nähe des Startlochs befinden.

Für diese Erklärung spricht die Tatsache, daß startlochnahe Peaks hauptsächlich bei proteinreichen Cytosolen auftraten und mit sinkender Proteinkonzentration immer seltener wurden.

4.5. Auswertung der Agargelelektrophorese

4.5.1. Parameter zur Qualitätskontrolle

Zur Beurteilung der Qualität unseres Arbeitens wurden für jeden Ansatz verschiedene Parameter festgelegt. Das war erstens der sogenannte Nullwert, d.h. die Radioaktivität in 50 µl Inkubat.

Die Werte A_1 und A_2, die die wiedergefundene Radioaktivität auf der Anodenseite der Gelplatte für Ansatz 1 und Ansatz 2 darstellen, B_1 und B_2 die Aktivität auf der kathodischen Seite der Platte für die jeweiligen Ansätze. Schließlich der x-Wert, das ist die Radioaktivität, die am Ende der Elektrophorese in der Pufferlösung des Startlochs noch vorhanden ist.

Der Quotient aus der Summe $A_1 + B_1$ + x-Wert geteilt durch den Nullwert desselben Ansatzes müßte unter idealen Bedingungen gleich 1 sein. Meistens aber war der Quotient kleiner als 1, das heißt, die eingesetzte Radioaktivität konnte nach Beendigung der Elektrophorese nicht vollständig wiedergefunden werden. Eine Erklärung dafür ist die Seitdiffusion. Nachgewiesenermaßen diffundieren nämlich während der Elektrophorese radioaktive Steroide und Steroid-Proteinkomplexe in das die jeweilige Bahn umgebende Agargel, wo sie nach dem Schneiden der Gelplatte für die Auswertung verloren sind. Der Verlust beträgt ungefähr 4 - 5 % nach jeder Seite (OETTLING, Dissertation Tübingen, in Vorbereitung). Eine andere, von JUNGBLUT et al. (1972) vorgeschlagene Erklärung wäre die Annahme, daß nach längerer Elektrophoresedauer die am weitesten vorgedrückten Steroid-Proteinkomplexe und Steroide über die Filterpapier-

Ionenbrücken in die Pufferlösung des Elektrophoresegerätes abwandern.

Die auf diese beiden beschriebenen Effekte zurückzuführenden Verluste an Radioaktivität betrugen in unseren Versuchen durchschnittlich 10 %.
Ein zweites Gütekriterium war der aus der Summe $A_1 + B_1 + x_1$ geteilt durch $A_2 + B_2 + x_2$ gebildete Quotient. Er müßte im günstigsten Falle den Wert 1 annehmen, da die Menge an eingesetztem radioaktiven Steroidhormon in den Ansätzen 1 und 2 gleich ist und dies auch nach der Elektrophorese sein sollte, will man verläßliche Resultate erhalten. Die so ermittelten Werte lagen meist zwischen 0,9 und 1,1. Diese Abweichungen von 10 % dürfte hauptsächlich durch Pipettierfehler verursacht sein. Der Pipettierfehler ist mit 10 % relativ groß, entspricht absolut gesehen aber nur einer Menge von 0,5 µl radioaktiven Hormons und ist damit kaum zu vermeiden.

4.5.2. Systematischer Fehler beim Rezeptornachweis durch Supprimierung der spezifischen Bindung

Neben diesem zufälligen Fehler ist noch ein unserer Methode innewohnender systematischer Fehler zu berücksichtigen. Er entsteht dadurch, daß in Ansatz 1 weniger radioaktives Hormon zur Markierung der unspezifischen Bindung zur Verfügung steht als in Ansatz 2. In diesem 2. Ansatz nämlich wird eben durch die Supprimierung der spezifischen Bindung, mit "kaltem" Hormon im Überschuß "heißes" Hormon gerade in dem Maße mehr zur Markierung der unspezifisch bindenden Proteine verfügbar gemacht, wie es der Größe der spezifischen Bindung entspricht. Mit anderen Worten: radioaktives Hormon, das in Ansatz 1 spezifisch gebunden ist, markiert im supprimierten Ansatz 2 zusätzlich unspezifisch bindende Proteine. Deshalb müßte man zu Ansatz 1 gerade soviel radioaktives Steroid mehr hinzugeben, wie zur

Markierung der spezifischen Bindung benötigt wird. Da man die Größe der spezifischen Bindung aber im Voraus nicht kennt, muß eine Korrektur im Nachhinein erfolgen.

4.5.3. Korrektur des systematischen Fehlers

Mit Hilfe der Korrekturformel von OETTLING, G. (Dissertation Tübingen, in Vorbereitung) läßt sich dieser systematische Fehler eliminieren. Ausgehend von der Vorstellung, daß das in Ansatz 2 mehr verfügbare radioaktive Hormon ein neues Gleichgewicht zwischen unspezifisch gebundenem Steroid und freiem Hormon schafft, kann man schließen, daß ein Teil des aus der spezifischen Bindung verfügbar gewordenen Hormons zur Kathode wandert und hier den Peak B_2 gegenüber B_1 vergrößert. Dies ist in der Tat der Fall (s. Abb. 1 - 3). Bildet man nun den Quotienten B_2/B_1, so hat man ein Maß dafür, um wieviel mehr unspezifische Bindung in Ansatz 2 im Vergleich zu Ansatz 1 gemessen wird. Würde man nur die Differenz Δ_{aus} $A_1 - A_2$ bilden, so verminderte dieses Mehr an unspezifischer Bindung in A_2 die Größe der errechneten spezifischen Bindung. Nach OETTLING korrigiert man deshalb zunächst A_2 durch Multiplikation mit dem Quotienten B_1/B_2 und subtrahiert dann diesen Ausdruck von A_1. Man erhält so die korrigierte spezifische Bindung $\Delta_{korr} = A_1 - A_2 \times B_1/B_2$.

4.5.4. Anwendungsbereich und Grenzen der Korrekturformel

Die Präzision der Bestimmung wird durch Anwendung der Korrekturformel erheblich verbessert. Insbesondere bei Analysen, die eine Langzeitinkubation erfordern, wird die Intraassayvarianz entscheidend verringert.

n	Inkubationszeit	V_{Δ} %	$V_{\Delta korr}$ %
8	1h 30'	10,4	4,7
8	24h	23,6	11,3
7	48h	53,2	12,4

Die Interassayvariation ist aus folgendem Experiment ersichtlich.
Das pulverisierte, gefrorene Homogenat der Prostata kastrierter Ratten wurde in 6 Portionen aufgeteilt und an 6 aufeinanderfolgenden Tagen analysiert. Der Anteil nativen saps wurde in Zehnerschritten von 0 - 100 % variiert, wobei das Inkubationsvolumen durch Zugabe von sap konstant gehalten wurde, der durch zwei Tage lange Lagerung bei Zimmertemperatur inaktiviert worden war. Es ergab sich ein linearer Anstieg der supprimierbaren Bindung mit steigender Konzentration nativen saps. Der Regressionskoeffizient über alle Konzentrationen nativen saps, berechnet nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate, war r = 0,989. Die Nachweisgrenze für die Bestimmung des Androgenrezeptors mit ^{3}H-DHT im Cytosol der Rattenprostata liegt bei 4fmol/mg Protein (MOELLER 1982). Für die Nachweisgrenze bei der DHT-R-Bestimmung im menschlichen Gewebe finden wir in der Literatur 20fmol/mg Protein (De VOOGT u. DINGJAN 1978). HICKS u. WALSH (1979) finden im inaktivierten sap 5fmol/mg Protein, geben aber keine Streuung an.
Wenn ungenau pipettiert wurde, so wird der in Abschnitt 4.5.3. erwähnte systematische Fehler völlig überspielt und der Peak B_2 kann auch kleiner als B_1 werden. Wir glauben, daß auch in diesem Fall, wenn auch nur in sehr engen Grenzen der Pipettierfehler durch die Korrekturformel ausgeglichen werden kann, da die Ausprägung der Peaks B_1 und B_2 selbstverständlich von der Menge an zugegebenem radioaktiven Steroid abhängt. Bei sehr groben Fehlern, wenn $A_1+B_1+x_1$ geteilt durch $A_2+B_2+x_2$ größer 1,1 bzw. kleiner 0,9 ist, wird die Möglichkeit einer rechnerischen Korrektur fraglich, weil die unterschiedlichen Mengen an zugegebenem Hormon dann in beiden

Ansätzen verschiedene Bindungsbedingungen schaffen. Den dadurch entstehenden Fehler können wir quantitativ nicht einschätzen. Unsere Hoffnung, daß mit Anwendung dieser Prüfgröße, also bei Ausschluß von Werten $< 0,9$ bzw. $> 1,1$, ein großer Teil der negativen Resultate entfiele, hat sich nicht erfüllt. Ebenso änderte sich nichts an den Ergebnissen der statistischen Auswertung. Wir können nicht vollständig ausschließen, daß auch Versuchsergebnisse mit Werten $< 0,9$ bzw. $> 1,1$ korrigierbar sind. Deshalb wurden alle Ergebnisse aufgeführt und ausgewertet. Wir haben allerdings bei den Wertetabellen im Anhang die zu den jeweiligen Versuchsergebnissen gehörende Prüfgröße (Ansatz 1 / Ansatz 2) angegeben, so daß damit die Zuverlässigkeit des entsprechenden Einzelergebnisses in etwa abgeschätzt werden kann.

4.5.5. Auswertung bei geänderten Voraussetzungen

Untersuchungen von MOELLER, H. (persönliche Mitteilung) in jüngster Zeit deuten darauf hin, daß DHT nach der Elektrophorese nur in den Fraktionen 9 - 13 nachweisbar ist. Radioaktive Substanzen in Fraktion 1 - 8 sind kein Dihydrotestosteron, aber auch keiner der geläufigen DHT-Metaboliten, wie Androstandiol oder Androsteron. Eine Identifizierung dieser Substanz(en) mittels Dünnschichtchromatographie ist bislang nicht gelungen. Aufgrund dieser Neuigkeit werteten wir unsere Ergebnisse neu aus, wobei wir das Δ_{korr} nur aus den Differenzen der Fraktionen 9 - 13 der beiden Ansätze berechneten. Allerdings veränderte diese Art der Auswertung das Gesamtbild nur wenig. Dies war auch nicht anders zu erwarten, da der Peak für die supprimierbare DHT-Bindung zwischen den Fraktionen 8 und 10 liegt und somit bei einer Auswertung, die nur die Fraktionen 9 - 13 berücksichtigt, meistens auch mit einbezogen wird.

Damit behalten die in Abschnitt 3 zusammengestellten Ergebnisse ihre Gültigkeit.

4.6. Wertigkeit von DNA- bzw. Proteingehalt als Bezugsgröße für die gemessene Rezeptorkonzentration

4.6.1. Erläuterung der Problematik an Beispielen

Wir haben für die gefundene Zahl an Rezeptorbindungsstellen den DNA- bzw. Proteingehalt des Cytosols als Bezugsgröße gewählt. Die Angabe des Rezeptorgehaltes in fmol/mg DNA ist nicht allgemein üblich. Nur in den Arbeiten von HICKS u. WALSH (1979) und EKMAN (1979) haben wir DNA als Bezugswert gefunden, während alle anderen Autoren die Zahl der Rezeptorbindungsstellen auf den Gehalt an Gewebeprotein oder den Proteingehalt des Cytosols bezieht.

Im Tierversuch wiesen TOFT u. O'MALLEY (1972) nach, daß unter Östrogengabe sowohl die Menge des Pg-R wie auch der Proteingehalt des Gewebes zunehmen, während der DNA-Gehalt des Gewebes unverändert bleibt. In diesem Fall war die echte Zunahme an Pg-R nur an den auf DNA bezogenen Werten zu erkennen. Im Gegensatz dazu berichten SULLIVAN u. STROTT (1973) von einer Abnahme des DNA-Gehaltes, wie auch des DHT-R in androgenabhängigen Zielgeweben (Rattenprostata) nach Orchidektomie. Entgegen dem ersten Beispiel wird hier bei den auf DNA bezogenen Werten der Rezeptorschwund nicht erkannt oder zu niedrig eingeschätzt.

Man steht also vor dem Problem,für eine variable Menge an Rezeptormolekülen eine konstante Bezugsgröße zu finden.

4.6.2. Gründe für die Bevorzugung des DNA-Gehalts als Bezugsgröße

Was normales Prostatagewebe betrifft, glauben wir, daß bei diesem der DNA-Gehalt der Zellen hinreichend konstant ist, um als Bezugswert zu dienen. Dagegen werden mit dem Proteingehalt des Cytosols sowohl intra-wie auch extrazelluläre Proteine erfaßt und man hat damit für die nur intrazellulär vorkommenden Rezeptormoleküle einen ungünstigen Bezugspunkt. Bei Carcinomen freilich ist der DNA-Gehalt der einzelnen Zelle aufgrund der Heterochromasie nicht mehr einheitlich. Die Bezugsgröße wird dadurch variabel, allerdings, wie wir meinen, in engeren Grenzen, als das bei dem Proteingehalt des Cytosols als Bezugswert der Fall wäre.

Trotz dieser Überlegungen, die den DNA-Gehalt eines Gewebes als die bessere Bezugsgröße erscheinen lassen, haben wir die Zahl der Rezeptorbindungsstellen auch auf 1 mg Cytosolprotein bezogen angegeben, um einen Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren zu ermöglichen.

4.7. Deutung der negativen Werte

4.7.1. Bedeutung des DHT-Reststoffwechsels

Negative Werte für die supprimierbare Bindung sind bei unseren Versuchen häufig aufgetreten. In der Literatur findet sich nirgendwo eine Beschreibung dieses Phänomens. Auch wir vermögen hierzu keine vollkommen befriedigende Erklärung zu geben, wollen aber dennoch einige unserer Vermutungen zu diesem Problem äußern.
Wie bereits an anderer Stelle erläutert wurde, kann eine Metabolisierung des DHT während der Inkubation zu einer Unterschätzung der spezifischen Bindung führen (vgl. 4.2.4.).

Wenn nun sehr wenige oder gar keine Rezeptoren im Inkubationsansatz vorhanden sind, ist es vorstellbar, daß dieser Effekt zum Auftreten negativer Werte führt, weil die unspezifische Bindung in Ansatz 2 zu hoch gemessen wird. Wir haben versucht,den DHT-Stoffwechsel durch Einsatz von NADase zu blockieren (vgl. 4.2.5.). Mit der von uns gewählten NADase-Konzentration von 40 µg/100 µl (s. 2.9.3.) ist mit einem Reststoffwechsel von ungefähr 20 % zu rechnen (MOELLER 1981). Es ist denkbar, daß in einigen Fällen durch diesen Reststoffwechsel negative Werte für die supprimierbare Bindung verursacht werden.

4.7.2. Zufällige Fehler

In unseren Versuchen sind kleine, zufällige Fehler unvermeidbar. Durch die vielen Arbeitsschritte (vgl. Teil 3) ist eine Summation solcher Fehler möglich. Welche Auswirkungen ein solcher Fehler hat,ist abhängig davon, wie groß das Meßsignal (spezifische Bindung) im Vergleich zum Störsignal (unspezifische Bindung) ist. Ein Beispiel soll das veranschaulichen:
Wenn A_1 = 200 cpm und A_2 = 100 cpm ist, dann ist $\Delta = A_1 - A_2$ = 100 cpm. Wenn man A_1 durch einen Fehler um 2 % zu niedrig bestimmt, dann gilt:
$A_1 - A_2$ = 196 cpm - 100 cpm = 96 cpm.
Ist man aber genötigt, die supprimierbare Bedeutung aus A_1 = 20 000 cpm und A_2 = 19 900 cpm zu errechnen, ist bei einer Unterschätzung von A_1 um 2 % die Folge, daß A_1 = 19 600 cpm wird und damit $A_1 - A_2$ = 19 600 cpm - 19 900 cpm = - 300 cpm.
Da besonders bei der Pg-R Bestimmung sehr hohe Zählraten für A_1 und A_2 resultierten, ist besonders hier der zufällige Fehler als Ursache für das Auftreten negativer Werte sehr wahrscheinlich.

4.7.3. Denaturierung der Rezeptorproteine

Bei der Verwendung von TUR-Spänen muß man mit einem gewissen Anteil an hitzedenaturierten Rezeptorproteinen rechnen (s. 4.1.1.). Im ungünstigsten Fall sind alle Rezeptorproteine denaturiert und damit nicht mehr nachweisbar. Obschon aufgrund der Hitzedenaturierung nur ein Verlust an Rezeptor bis hin zu 0 fmol Bindungsstellen erklärbar ist, ist es eine Tatsache, daß negative Werte nur bei Verarbeitung von TUR-Gewebe auftraten. Wie dieser Effekt zustande kommt,vermögen wir nicht zu erklären, wollen ihn aber hier als eine bemerkenswerte Beobachtung festgehalten wissen.

4.7.4. Bindungsverhältnisse im heißen und im supprimierten Ansatz

Im heißen und im supprimierten Ansatz herrschen unterschiedliche Bindungsverhältnisse. Im heißen Ansatz sind nämlich $3{,}33 \times 10^{-8}$M ^{3}H-Steroid enthalten, im kalten Ansatz $3{,}33 \times 10^{-8}$ ^{3}H-Steroid und $3{,}33 \times 10^{-6}$M Steroid. Zwar wird im supprimierten Ansatz nur ein Hundertstel der Gesamtbindung erfaßt, da heißes und kaltes Steroid in diesem Ansatz im Verhältnis 1 : 100 enthalten ist. Die Bindungskurven für die unspezifische Bindung im heißen und im supprimierten Ansatz zeigen dennoch einen etwas unterschiedlichen Verlauf. Unter der Annahme, in beiden Ansätzen seien keine Rezeptormoleküle enthalten, kann man für die unspezifische Bindung folgende Gleichung aufstellen:

$$[HP] = \frac{[H] \cdot B_p}{[H] + K_p}$$

Dabei bedeuten $[HP]$ Konzentration des Steroid-Protein Komplexes, $[H]$ Konzentration des freien Steroids, B_p Kapazität der unspezifischen Proteinbindung und K_p die Dissoziationskonstante der unspezifischen Bindung.
Dabei sei $B_p = 10^{-4}M$ und $K_p = 10^{-4}M$, was einem Durchschnittswert der aus der Literatur entnommenen Angaben entspricht.

Für Ansatz 1 gilt nun: $$[HP]_1 = \frac{[H] \cdot B_p}{[H] + K_p}$$

Für Ansatz 2 gilt: $$[HP]_2 = \frac{[H + 100\ H] \cdot B_p}{[H + 100\ H] + K_p} \cdot \frac{1}{100}$$

Sind die Bindungskurven für Ansatz 1 und Ansatz 2 identisch, so hat die Gleichung $HP_1 = HP_2$ unendlich viele Lösungen. Sind die Bindungskurven unterschiedlich, so hat diese Gleichung entweder eine Lösung, wenn sich die Kurven schneiden oder keine Lösung, wenn sie keinen Punkt gemeinsam haben.

Die Gleichung $[HP]_1 = [HP]_2$ ist lösbar für eine definierte Konzentration H. Da sich beide Bindungskurven in diesem Punkt schneiden, nennen wir diese Konzentration H_s.
In unserem Beispiel ist $H_s = 10^{-8}M$. Rechnungen mit Zahlenbeispielen zeigen:
Ist $[H] < [H]_s$ dann ist $A_1 < A_2$, ist $[H] > [H]_s$ dann ist $A_1 > A_2$.

Diese modellhafte Berechnung hat zwei Nachteile. Zum einen wird der Einfluß der Rezeptorbindung vernachlässigt. Allerdings zeigen Berechnungen von KOZ, A. (persönlichen Mitteilung), daß auch bei deren Berücksichtigung eine Unterschätzung der spezifischen bindung bis hin zu negativen Werten möglich ist.

Andererseits ist die unspezifische Bindung HP durchaus nicht einheitlich, sondern vielmehr als eine Summe zahlreicher undefinierter Steroid-Protein Bindungen aufzufassen. Damit ist eine hinreichend genaue Berücksichtigung der Bindungsverhältnisse in Ansatz 1 und Ansatz 2 unmöglich.

Als Schlußfolgerung aus diesen Betrachtungen bleibt aber folgendes festzuhalten. Durch den unterschiedlichen Verlauf der Bindungskurven für die unspezifische Bindung in Ansatz 1 und Ansatz 2 ist die Möglichkeit gegeben, daß falsch positive Ergebnisse durch eine zu hohe bzw. falsch negative Ergebnisse durch eine zu niedrige Ligandenkonzentration entstehen können. Nur bei einer bestimmten Hormonkonzentration, nämlich $[H]_S$, herrschen in Ansatz 1 und 2 die gleichen Bindungsverhältnisse. Streng genommen dürften Rezeptorbestimmungen durch Supprimierung der spezifischen Bindung nur bei dieser Ligandenkonzentration durchgeführt werden. Diese Forderung ist allerdings in der Praxis nicht zu verwirklichen. Die Charakteristik der unspezifischen Bindung ist nämlich nicht eindeutig definiert, so daß keine genauen Daten zur Berechnung von $[H]_S$ zur Verfügung stehen.

4.8. Grundlagen der statistischen Auswertung

4.8.1. Wertigkeit des normalen Prostatagewebes als Bezugspunkt zur Beurteilung des veränderten Rezeptorprofils im Carcinomgewebe

Bei der Gegenüberstellung von Carcinom- und normalem Drüsengewebe muß man berücksichtigen, daß dieses normale Drüsengewebe nur histologisch die Kriterien für den Befund "normal"erfüllt. Über diese rein morphologische Begutachtung hinaus bleibt zu prüfen, ob auch hinsichtlich des Rezeptorprofils in den normalen Geweben eine ausreichende Homogenität gewährleistet ist, um die hier gewonnenen Werte als ein

Kollektiv den Carcinomen gegenüber stellen zu können. Dies um so mehr, da die normalen Gewebsspäne, die histologisch der Klassifikation 0/0 entsprachen sowohl von Adenom- wie auch Carcinompatienten stammen. Deshalb muß man in Rechnung stellen, daß dieses sogenannte Normalgewebe aus einem kranken Organ, letztendlich aus einem kranken Organismus entnommen wurde und somit Veränderungen aufweisen kann, die mit histologischen Methoden allein nicht erkennbar sind.

Beim Vergleich des normalen Drüsengewebes von Adenom- bzw. Carcinompatienten fanden wir im begleitenden Drüsengewebe der Carcinome weniger DHT-R als im begleitenden Drüsengewebe der Adenome. Ein solcher Unterschied war bei der Verteilung des $Ö_2$-R und Pg-R nicht feststellbar (FLÜCHTER et al. 1982). Dennoch ist es nötig, die von uns als Normalgewebe aufgeführten Proben in Hinblick auf ihre Eignung als Referenzpunkte in der statistischen Auswertung skeptisch zu beurteilen.

Eine weitere Unsicherheit bei der Beurteilung des Normalgewebes besteht darin, daß der Einfluß des Alters auf die Hormonrezeptorenkonzentration in der Prostata noch ungeklärt ist. SHAIN, S.A. hat diese Frage im Tierversuch an Rattenprostaten untersucht (SHAIN et al. 1973, 1975a). Dabei sahen SHAIN et al. eine Abnahme des DHT-R mit steigendem Alter bis auf 14 % des bei jungen, reifen Tieren festgelegten Ausgangswertes. Gleichzeitig war die DHT-Retentionsfähigkeit der Prostaten bis auf 45 % vermindert. Arbeiten über solche altersabhängige Veränderungen der Rezeptorausstattung der menschlichen Prostata sind uns nicht bekannt. Zwar gibt es eine Anzahl von Arbeiten über die Änderung des Hormonmilieus im Senium (VERMEULEN et al 1971, KENT et al. 1973, DOERR u. PIRKE 1974), daraus aber Schlüsse auf das Verhalten der entsprechenden Hormonrezeptoren abzuleiten, wäre sicher verfehlt.

Das Verhalten des DHT-R nach Kastration ist von SULLIVAN und STROTT (1973) im Tierversuch beschrieben worden. Die Ausschaltung der endogenen Androgenquellen durch Kastration oder Supprimierung der Gonadotropine mit Diethylstilböstrol (DES) bewirkt einen rapiden Schwund des DHT-R bis zum dritten Tag nach der Kastration. Die DHT-R Konzentration nimmt anschließend auch ohne hormonelle Stimulation langsam wieder zu, ohne die ursprünglichen Werte zu erreichen. Dies war auch dann der Fall, wenn die Versuchstiere zusätzlich adrenalektomiert und hypophysektomiert wurden. Durch Androgensubstitution ist es allerdings möglich, den verminderten DHT-R Gehalt orchidektomierter oder alter Ratten wieder auf das Niveau junger, reifer Tiere anzuheben (BOESEL et al. 1980).

Es sei dahingestellt, inwieweit die physiologischen, altersabhängigen Veränderungen des Hormonmilieus durch Kastration simuliert werden können. Darüberhinaus sind DHT-R bei kastrierten Individuen leichter nachzuweisen, wegen der größeren Zahl an unbesetzten Rezeptoren, so daß eine Beurteilung des tatsächlichen Ausmaßes des Rezeptorschwundes nach Kastration äußerst problematisch ist.

Zusammenfassend kann man sagen, daß eine Unsicherheit in der Beurteilung des Normalgewebes dadurch entsteht, daß die entsprechenden Gewebespäne von unterschiedlichen Patienten stammen und somit große interindividuelle Unterschiede aufweisen können. Nur wenn diese Unterschiede gering sind, ist es statthaft, diese Gewebeproben als ein Kollektiv den Carcinomproben gegenüberzustellen. Von dieser Annahme gehen wir bei unserer statistischen Auswertung aus.

4.8.2. Gründe für die gemeinsame Betrachtung von wenig differenzierten Adenocarcinomen und anaplastischen Carcinomen

Bei der Gegenüberstellung von Normalgewebe und Carcinomgewebe haben wir alle Carcinome, also wenig differenzierte Adenocarcinome und anaplastische Carcinome zu einer Gruppe zusammengefaßt. Dieses Vorgehen ist durch zwei Gründe gerechtfertigt. Erstens sind die Unterschiede zwischen beiden Carcinomarten fließend, so daß ihre Abgrenzung gegeneinander in manchen Fällen mehr oder weniger willkürlich erfolgen muß. Zweitens konnten wir bei den von uns untersuchten Carcinomproben keinen Unterschied hinsichtlich der Rezeptorenverteilung zwischen wenig differenzierten Adenocarcinomen und anaplastischen Carcinomen feststellen. Was den Rezeptorgehalt angeht, stellen beide Carcinomsorten ein Kollektiv dar, welches man, ohne einen Fehler zu machen, der Gruppe der Normalgewebeproben gegenüberstellen kann.

4.8.3. Auswahl der Werte und Aussagekraft der Statistik

Bei der statistischen Auswertung konnten wir die negativen Werte nicht berücksichtigen. Wir haben damit eine Auslese getroffen, die eventuell das Ergebnis verfälscht. Um tendenzielle Unterschiede im Muster der Rezeptorenverteilung in den einzelnen Gewebearten festzustellen, ist es deshalb besser, die Absolutwerte zu betrachten, als sich auf die Statistik zu verlassen.

Größere Aussagekraft hat die Gegenüberstellung von Carcinom- und Normalgewebe jeweils eines Patienten. Hier sind die an anderer Stelle (s. 4.8.1.) diskutierten interindividuellen Unterschiede des Untersuchungsmaterials nicht vorhanden. Nachteilig bei dieser Betrachtungsweise ist die geringe

Zahl von Meßwerten pro Patient. Aus diesem Grund hielten wir in diesem Fall eine statistische Auswertung für unangebracht.

4.9. Ergebnisse anderer Autoren

4.9.1. Erläuterungen zu Tabelle III

In der nachfolgenden Tabelle III sind die Resultate der Autoren aufgeführt, die wie wir eine quantitative Bestimmung der Steroidhormonrezeptoren im menschlichen Prostatagewebe durchführten.

Es mag zweifelhaft erscheinen, wenn man Prostatacarcinome verschiedenen Differenzierungsgrades ohne nähere Erläuterung in einer Tabelle vergleichend nebeneinander stellt. Man kann dies dadurch rechtfertigen, daß die meisten Autoren einen Unterschied zwischen verschieden differenzierten Carcinomen nicht feststellen konnten und somit eine Aufschlüsselung ihrer Ergebnisse nach dem Differenzierungsrad der von ihnen untersuchten Carcinome keine weitere Information mit sich bringen würde. Nur dort, wo ausdrücklich auf einen signifikanten Unterschied zwischen hochdifferenzierten Adenocarcinomen und entdifferenzierten Carcinomen hingewiesen wird (SNOWCHOWSKI et al. 1977), haben wir diese Angaben auch in unsere Tabelle übernommen. Die Faktoren, die nach unserer Meinung das Ergebnis am meisten beeinflussen, wie z.B. Art des Untersuchungsmaterials und die Methode des Rezeptornachweises, haben wir in Stichworten genannt. Damit dient die Tabelle vorrangig einem Vergleich der Effizienz der Methoden bzw. der Qualität des eingesetzten Materials.

Beim Vergleich der aufgeführten Resultate ist zu beachten, daß in einem Teil der Fälle das Ergebnis in fmol/mg DNA, sonst aber in fmol/mg Protein angegeben sind. Diese Werte

korrelieren zwar nicht streng, jedoch können wir aufgrund unserer eigenen Erfahrungen sagen, daß der auf 1 mg DNA bezogene Wert zirka 20 - 50 mal größer ist als der auf 1 mg Protein bezogene Wert (Tabelle s.S. 71u.72)

4.9.2. Schwierigkeiten beim Vergleich der einzelnen Ergebnisse

Es ist schwierig,unsere Ergebnisse mit denen anderer Autoren zu vergleichen. In den Fällen, wo eine der unseren vergleichbare Methode zum Rezeptornachweis angewandt wurde (WAGNER u. SCHULZE 1978a, De VOOGT u. DINGJAN 1978), wurde entweder anderes Material verwendet oder nicht angegeben, welche Ergebnisse mit welchem Material erzielt wurden. Die Autoren, die wie wir TUR-Späne verarbeiteten (SIDH et al. 1979, GUSTAFFSON et al. 1978), verwandten den "Charcoal assay". Die Voraussetzungen, die für einen direkten Vergleich nötig wären, sind also nicht gegeben. Vielmehr sind wir gezwungen, wenn wir den Einfluß der Methode auf die Ergebnisse untersuchen, bewußt die Verschiedenheit des analysierten Materials zu vernachlässigen und umgekehrt.

Tabelle III: Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen anderer Autoren

Autor	Material	Methode	DHT-R	δ_2-R	Pg-R
SIDH et al. 1979	TUR	R1881-Austausch DHT-Austausch CC-assay	0-2543	0-36	n.b.
EKMAN 1979	Biopsie	R1881-Austausch CC-assay	51-318^{+}	n.b.	n.b.
GUSTAFFSON et al. 1978	TUR Biopsie Ektomie	R5020-Austausch DCC-assay	n.b.	n.b.	3-7
HICKS und WALSH 1979	Ektomie	R1881-Austausch DCC-assay	269$\pm$62^{+}	n.b.	n.b.
KRIEG et al. 1978	Kryochi-rurgie	DHT-Austausch Agargelelpho R1881-Austausch DCC-assay	6-93,5	4,2-14,3	n.b.
SHAIN et al. 1980	Ektomie	R1881-Austausch CC-assay	520-5190	n.b.	n.b.
SNOWCHOWSKI et al. 1977	Ektomie	R1881-Austausch CC-assay	13-14,2 23-29,4	hochdiff. Adeno-Ca undiff. Adeno-Ca	

Fortsetzung zu Tabelle III:

Autor	Material	Methode	DHT-R	$Ö_2$-R	Pg-R
De VOOGT und DINGJAN 1978	TUR Ektomie Biopsie	DHT-Austausch Agargelelpho	0-1621 0-205	0-829 0-15507	DES behandelt unbehandelt
PERTSCHUK et al. 1979	Ektomie	Fluorescein-markierung	9 von 14 Proben DHT-R pos. 8 von 14 Proben $Ö_2$-R pos.		
WAGNER und SCHALZE 1978a	Biopsie	DHT-Austausch Agargelelpho	4 von 7 Proben DHT-R pos. 3 von 7 Proben $Ö_2$-R pos.		
eigene Ergebnisse	TUR	DHT-Austausch Inkubation mit NADase Agargelelpho	0-560+ 0-29	0-16726+ 0-376	0-6081+ 0-224

+: fmol/mg DNA, sonst fmol/mg Protein

n.b.: nicht bestimmt

e: eigene Ergebnisse ohne negative Resultate

4.9.3. Vergleich der Methoden und des Materials

Die Zahl nachgewiesener Bindungsstellen ist bei der Verwendung des Charcoal assay (SIDH et al. 1979, EKMAN 1979, HICKS und WALSH 1979, KRIEG et al. 1978, SHAIN et al. 1980, SHNOWCHOWSKI at al. 1977) gleich hoch oder höher als bei der Anwendung der Agargelelektrophorese als Separierungsmethode. Dies steht im Widerspruch zu den von JUNGBLUT et al. (1972)vorgelegten Ergebnissen. Danach ist bei der Agargelelektrophorese mit einer 40 - 50 % höheren Rezeptorausbeute gegenüber dem Charcoalassay zu rechnen. Andererseits besteht beim Charcoal-assay die Gefahr, unter ungeeigneten Versuchsbedingungen falsch positive bzw. zu hohe Werte zu erhalten, wie an andrer Stelle bereits ausführlich diskutiert wurde (s. 4.4.3.).

Ein deutlicher Unterschied zwischen den Ergebnissen bezüglich des verwendeten Materials ist genausowenig festzustellen. Sowohl im TUR- als auch Biopsie- oder Ektomiematerial sind Steroidhormonrezeptoren in vergleichbarer Menge nachzuweisen.

4.9.4. Vergleich von DHT und R1881 als Ligand für den DHT-Rezeptor

Ob man DHT oder Methyltrienolon als Liganden verwendet, scheint die Ergebnisse hinsichtlich der Konzentration an nachweisbarem DHT-R nicht zu beeinflussen. KRIEG et al. (1978) finden mit beiden Liganden identische Ergebnisse. SHAIN et al. (1980) habem mit R1881 eine höhere DHT-R Ausbeute als wir mit dem physiologischen DHT. Dies hat vermutlich zwei Gründe. Durch die Verwendung einzelner TUR-Späne ist die Histologie unseres Materials eindeutiger definiert als das bei einem Ektomiepräparat der Fall sein kann, wo unausweichlich auch Anteile normalen Drüsengewebes mitverarbeitet werden, die nach unseren Erfahrungen

einen höheren DHT-R Gehalt haben als das Carcinomgewebe selbst. Andererseits stellten wir bei TUR-Spänen einen Rezeptorverlust von zirka 30 % gegenüber einem vergleichbaren Ektomiegewebe fest (vgl. 4.1.1.). Die oft zitierte geringe Bindungsaffinität des DHT verglichen mit R1881 wird mit großer Wahrscheinlichkeit nur durch den während der Inkubation auftretenden DHT-Metabolismus vorgetäuscht (vgl. 4.3.2.).
Dies ist deshalb sicher nicht der Grund für die höhere DHT-R Ausbeute in SHAINS Arbeit.

4.10. Diskussion der eigenen Ergebnisse

4.10.1. Unterschiede zwischen normalem Prostatagewebe und Prostatacarcinomgewebe

Eine Unterscheidung des normalen Gewebes von Carcinomgewebe anhand der Verteilung des DHT-R war nicht möglich. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist mit $p=0,2$ nicht signifikant genug, um aus den Resultaten irgendwelche Schlüsse zu ziehen. Bemerkenswert ist aber, daß sehr hohe Konzentrationen des DHT-R nur im normalen Prostatagewebe zu verzeichnen waren. Man könnte sich vorstellen, diese hohen Rezeptorkonzentrationen seien nur bei den am wenigsten thermisch geschädigten Gewebsspänen ermittelt worden, während sich in den übrigen Fällen durch die wärmebedingten Rezeptorverluste die Unterschiede zwischen normalem und Carcinomgewebe verwischen. Da wir die TUR-Späne nicht in Hinblick auf eine thermische Schädigung untersucht haben, muß dieser Gedanke eine bloße Vermutung bleiben.

Dagegen waren Carcinom- und normales Gewebe anhand der Verteilung des $Ö_2$-R zu unterscheiden. Normales Prostatagewebe enthält signifikant ($p=0,05$) mehr $Ö_2$-R als Carcinomgewebe.

4.10.2. Anwesenheit des Östradiolrezeptors im Prostatacarcinomgewebe

Die Anwesenheit des $Ö_2$-R im Prostatagewebe läßt vermuten, daß die Prostata auch Zielorgan für Östrogene ist. Die indirekten Wirkungen der Östrogene wie Verminderung der Gonadotropinausschüttung, Verminderung der Testosteronsekretion und Hemmung der Konversion von Testosteron zu DHT sind gut untersucht (MENON u. WALSH 1979). Das Prinzip der Wirkung ist eine Verminderung des verfügbaren DHT in der Zielzelle und damit das Ausbleiben der durch den Androgenrezeptor vermittelten Effekte. Dagegen ist wenig bekannt über einen direkten, also durch den $Ö_2$-R vermittelten, Effekt an der Prostata. Da auch Prostatacarcinomgewebe den $Ö_2$-R in unterschiedlichen Mengen enthält, wäre es besonders wichtig, diesen Direkteffekt der Östrogene an der Prostata aufzuklären, weil sich hieraus eventuell neue therapeutische Prinzipien zur Behandlung des Prostatacarcinoms ableiten ließen.

4.10.3. Beurteilung der bei der Bestimmung der Progesteronrezeptoren gewonnenen Ergebnisse

Die bei der Bestimmung des Pg-R gewonnenen Ergebnisse können wir bislang noch nicht einordnen. Die weite Streuung und das gehäufte Auftreten negativer Werte machen eine sinnvolle Interpretation der Ergebnisse unmöglich. Nähere Ausführungen zu den technischen Problemen der Rezeptorbestimmung, die eine Erklärung für die bei der Pg-R Bestimmung ermittelten Werte bieten, finden sich unter Punkt 4.7.2..

4.10.4. Vergleich von Carcinom- und Normalgewebe je eines Patienten

Größere Aussagekraft hat die Gegenüberstellung von Carcinom- und Normalgewebe jeweils eines Patienten, wie bereits unter 4.8.4. ausgeführt wurde. Allerdings führt diese Art der Darstellung nicht über das bisher Gesagte hinaus. Wiederum ist nur hinsichtlich des $Ö_2$-R ein Unterschied zwischen Normal- und Carcinomgewebe erkennbar. Wir werden diese Aufstellung im Kapitel "Klinische Beobachtungen" (s. 4.11.2.) noch eingehender diskutieren.

4.10.5. Aussagekraft der Quotienten $Ö_2$-R/Pg-R, $Ö_2$-R/DHT-R, Pg-R/DHT-R

Bei einem Vergleich der gebildeten Quotienten ist besonders das Verhältnis von $Ö_2$-R zu Pg-R interessant. Aus Tierversuchen ist bekannt, daß die hormonelle Stimulation eines Zielgewebes mit Östrogenen dort ein sprunghaftes Ansteigen des Pg-R zur Folge hat (TOFT u. O'MALLEY 1972). Wir wollten eine solche Wechselwirkung zwischen $Ö_2$-R und Pg-R in der Prostata untersuchen, wobei uns natürlich besonders die Veränderungen des Verhältnisses $Ö_2$-R/Pg-R im Carcinomgewebe interessiert. Unsere Ergebnisse (Abb. 13, Spalte 1) scheinen zu beweisen, daß sich das Muster der Rezeptorenverteilung im normalen Gewebe von dem im Carcinomgewebe signifikant unterscheidet. Jedoch ist anzumerken, daß sich, wie wir bereits vorher sahen, normales Gewebe durch einen besonders hohen $Ö_2$-R Gehalt auszeichnet, während die Werte für den Pg-R wahllos verteilt sind. Damit wird die Größe des errechneten Quotienten überwiegend vom $Ö_2$-R Gehalt der untersuchten Probe bestimmt. Es ist also anzunehmen, daß der signifikante Unterschied ($p = 0,05$) zwischen Normalgewebe und Carcinomen nur scheinbar vorhanden ist, in Wirklichkeit aber nicht über die schon getroffene Feststellung hinausführt, daß sich

normales Gewebe von Carcinomgewebe durch einen besonders hohen $Ö_2$-R Gehalt unterscheidet.

Diese Aussage gilt mit Einschränkungen auch für den Quotienten $Ö_2$-R/DHT-R. Obwohl die Bestimmung des DHT-R eine gewisse Tendenz hin zu höheren Werten bei normalem Gewebe erkennen ließ, war quantitativ meistens sehr viel weniger DHT-R nachweisbar als $Ö_2$-R. So ist auch hier der $Ö_2$-R für den Wert des errechneten Quotienten ausschlaggebend.

Erstaunlich ist, daß das Verhältnis Pg-R/DHT-R, die jeder für sich allein wenig aufschlußreiche Ergebnisse liefern, in dieser Aufstellung ein recht klares Bild ergeben. Es zeigt sich eine Tendenz hin zu einem höheren Pg-R Anteil im normalen Gewebe. Der Unterschied zwischen Normal- und Carcinomgewebe ist auf dem Niveau $p = 0,2$ nicht signifikant. Das kann an der geringen Zahl der Quotienten liegen, die gebildet werden konnten, da besonders, wie man sich erinnert, bei der Bestimmung von Pg-R und DHT-R häufig negative Werte auftraten. Dennoch erscheint uns der niedrige Quotient Pg-R/DHT-R als Merkmal des Carcinomgewebes weiterer Nachforschungen wert.

4.11. Klinische Beobachtungen

4.11.1. Daten zu den vier nachbeobachteten Patienten

Bei vier Patienten, deren Prostatagewebe wir untersucht haben, hatten wir die Gelegenheit, ihr Schicksal über zwei Jahre hinweg zu verfolgen. Wir machen hier den Versuch, retrospektiv die von uns erhobenen Werte mit dem klinischen Verlauf in Verbindung zu bringen.

Drei Patienten hatten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein metastasierendes $T_3G_3M_1$-Prostatacarcinom (E.J., S.A., W.M.), einer ein $T_4G_3M_1$-Prostatacarcinom (W.A.). Nach palliativer TUR bestand die Therapie bei allen vier Carcinompatienten einheitlich in Kastration und Hormontherapie. Dabei erhielten die Patienten vom 10. postoperativen Tag an täglich 900 mg Honvan (Diäthylstilböstroldiphosphat) 11 Tage lang. Anschließend in vierwöchigen Abständen 80 mg Estradurin (Polyöstradiolphosphat). Nach einer Beobachtungszeit von zwei Jahren starb der Patient W.A. an seinen Metastasen. Die übrigen drei Patienten mit einem T_3G_3-Prostatacarcinom sprechen bisher gut auf die Hormontherapie an.

4.11.2. Vergleich der Rezeptorprofile von hormonsensiblen und hormontauben Carcinomen

Wir wollen an dieser Stelle die Rezeptorprofile dieses einen "hormontauben" und der drei "hormonsensiblen" Carcinome miteinander vergleichen. Diese Rezeptorprofile sind den Abbildungen 10 - 12 zu entnehmen. Wie man sieht, ist der Unterschied zwischen dem Normalgewebe und dem Gewebe des hormontauben Carcinoms (W.A.) wenig ausgeprägt. Im hormontauben Carcinom ließen sich annähernd gleiche Konzentrationen an DHT-R, Pg-R und $Ö_2$-R nachweisen, wie im normalen Drüsengewebe des gleichen Patienten. Ganz anders sind dagegen die Verhältnisse bei den hormonsensiblen Carcinomen (E.J., S.A., W.M.). Mit Ausnahme des Patienten S.A. war die DHT-R Konzentration in den hormonsensiblen Carcinomen deutlich niedriger als im zugehörigen Normalgewebe. Ebenso war bei allen drei hormonsensiblen Carcinomen deutlich weniger $Ö_2$-R nachweisbar als im normalen Gewebe. Der Pg-R war im normalen, umgebenden Drüsengewebe der hormonsensiblen Carcinome in zwei Fällen nicht nachweisbar (E.J., W.M.). In einem Fall war die Pg-R Konzentration geringer als im

Carcinomgewebe. Das Rezeptorprofil des hormontauben Carcinoms ähnelt also weitgehend dem des normalen Gewebes. Die hormonsensiblen Carcinome hatten dagegen weniger DHT-R und $Ö_2$-R als vergleichbares Normalgewebe, aber sie enthielten eine höhere Pg-R Konzentration.
Die von FLÜCHTER, S.H. et al. (1982, noch im Druck) veröffentlichten Ergebnisse unterstreichen diese Aussage. Seine Daten stammen von sechs Carcinompatienten. Vier dieser Patienten sind mit den oben genannten identisch. Nach zweijähriger Nachbeobachtung waren trotz Hormontherapie zwei Patienten an ihren Metastasen gestorben, während die übrigen vier weiterhin gut auf die Hormontherapie ansprechen. In FLÜCHTERS Arbeit werden aber nicht wie bei uns Normal- und Carcinomgewebe jweils eines Patienten miteinander verglichen. Vielmehr faßt er die bei den zwei hormontauben und den vier hormonsensiblen Carcinomen erhobenen Daten jeweils zusammen und stellt diese dann einander gegenüber. Dabei sind im hormontauben Carcinom signifikant mehr nukleäre DHT-R, Pg-R und $Ö_2$-R nachweisbar als im Gewebe des hormonsensiblen Carcinoms. Für den hier diskutierten Cytosolrezeptor war ein solcher Unterschied zwischen hormonsensiblem und hormontaubem Carcinom nur in Hinblick auf den $Ö_2$-R statistisch signifikant. Ein den nukleären DHT-R und P_g-R vergleichbares Verhalten bei den entsprechenden Cytosolrezeptoren war jedoch nur andeutungsweise vorhanden.

Dies ist ein völlig unerwartetes Resultat. Gemäß der heute allgemein akzeptierten Vorstellung ist die Wirkung einer hormonablativen Therapie (Kastration und Östrogengabe) an das Vorhandensein der von diesem Hormonentzug betroffenen Rezeptoren gebunden. Man müßte demzufolge erwarten, daß gerade die in ihrem Rezeptorprofil dem Normalgewebe am ähnlichsten Carcinome am besten auf eine Hormontherapie ansprechen. Nach unseren Erkenntnissen ist das aber gerade nicht der Fall. Eine hohe Rezeptorkonzentration, insbesondere des $Ö_2$-R, scheint die Wirksamkeit einer hormonablativen Therapie in Frage zu stellen.

4.11.3. Korrelation der Prognose des Prostatacarcinoms mit dem Rezeptorprofil bei anderen Autoren

EKMAN, P. (1979) schließt aus seinen Beobachtungen, daß eine hormonablative Therapie dann sinnvoll ist, wenn DHT-R im Gewebe nachweisbar ist. Diese Aussage wird durch die Arbeit von PFITZENMAIER, N. et al. (1977) bestätigt.

De VOOGT, H.J. und DINGJAN, P.G. (1978) kommen in ihrer Studie zu dem Schluß, daß Carcinome mit nachweisbarem $Ö_2$-R hormonsensitiv sind.

SIDH, S.M. et al.(1979) differenzieren ihre Aussage etwas genauer: Unabhängig vom DHT-R Gehalt sind Carcinome mit hohem $Ö_2$-R Gehalt hormonsensitiv. Dagegen soll ein hoher DHT-R Gehalt für die hormontauben Carcinome typisch sein.

Die Resultate von De VOOGT, H.J. wie auch SIDH, S.M. et al. lassen den Schluß zu, daß eine direkte, an der Carcinomzelle selbst angreifende Östrogenwirkung für den Therapieerfolg verantwortlich ist, weil die Prognose offensichtlich nicht vom Vorhandensein des DHT-R abhängt. Dies müßte aber der Fall sein, wollte man allein die Supprimierung der Gonadotropine durch Östrogengabe für das einzige Wirkungsprinzip halten.

4.11.4. Abschließende Betrachtungen

Die Identifizierung hormonsensibler Prostatcarcinome anhand ihres Rezeptorprofiles wird, wie wir sahen, von den verschiedenen Autoren sehr unterschiedlich gehandhabt. Während die einen die Anwesenheit des DHT-R als Kriterium für die Hormonsensibilität ansehen, halten die anderen den $Ö_2$-R für den ausschlaggebenden Faktor. Einigkeit herrscht jedoch hinsichtlich der Auffassung, daß die Anwesenheit von Hormonrezeptoren, welcher Art sie nun letztendlich sein

mögen, ein Kriterium für das Vorliegen eines hormonsensiblen Prostatacarcinoms darstellt. Unsere Beobachtungen stehen zu dieser Ansicht in krassem Widerspruch. Denn unsere Ergebnisse weisen in die Richtung, daß gerade die hormonsensiblen Carcinome wenig DHT-R und $Ö_2$-R aufweisen, während die hormontauben Carcinome ein Rezeptorprofil zeigen, das weitgehend dem des umgebenden, normalen Drüsengewebes entspricht.

Wir müssen betonen, daß sich unsere aus der klinischen Beobachtung gezogenen Schlüsse nur auf eine äußerst geringe Zahl von Fällen beziehen. Es ist deshalb nicht ausgeschlossen, daß im Laufe der Zeit, wenn uns Daten von weiteren Patienten zur Auswertung zur Verfügung stehen, die hier beschriebenen Fälle die Ausnahme von der Regel darstellen. Unsere Folgerungen sollen deshalb nicht als verbindliche Mitteilungen verstanden werden, sondern vielmehr Hinweise geben auf weitere mögliche Aspekte eines offensichtlich sehr komplexen Problems, wie es das Prostatacarcinom darstellt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel unserer Arbeit war die quantitative Bestimmung der cytoplasmatischen Rezeptoren für die Steroidhormone Dihydrotestosteron, Progesteron und Östradiol im menschlichen Prostatagewebe.

Das Prostatagewebe wurde durch transurethrale Elektroresektion gewonnen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Analyse bei - 70° C aufbewahrt.
Nach der Homogenisation und Zentrifugation erfolgte die Bestimmung der Hormonrezeptoren im 100 000g-Überstand. Gleiche Teile des Cytosols wurden entweder mit ^{3}H-DHT oder mit ^{3}H-DHT und R1881 in hundertfachem Überschuß bei + 4° C 22 Stunden lang inkubiert. Die Bestimmung der Progesteronrezeptoren erfolgte in analoger Weise mit ^{3}H-R5020 und R5020, die Bestimmung der Östradiolrezeptoren mit ^{3}H-Östradiol und Östradiol.
Die Tennung von gebundenen und ungebundenen Liganden erfolgte mit der Agargelelektrophorese, wie bei WAGNER (1978) beschrieben. Mit dieser Methode wird eine vollständige Trennung zwischen spezifisch bindenden Rezeptorproteinen und dem ebenfalls spezifisch Steroidhormone bindenden SHBG erreicht. CBG wandert während der Elektrophorese wie die Rezeptorproteine zur Anode. Um eine Unterscheidung zwischen Progesteronrezeptoren und CBG zu ermöglichen, verwenden wir R5020 als Liganden, welches keine Affinität zu CBG aufweist (RAYNAUD 1977). Die Ermittlung der spezifisch gebundenen Steroidhormone erfolgte durch Subtraktion der für Ansatz 2 (radioaktives Hormon und hundertfacher Überschuß nicht radioaktives Hormon) auf der Anodenseite der Gelplatte gemessenen Radioaktivität von der, auf der Anodenseite gemessenen Aktivität für Ansatz 1. Die so erhaltenen Werte wurden nach der von OETTLING (Dissertation Tübingen, in Vorbereitung) beschriebenen Formel korrigiert. Die errechnete Rezeptormenge wurde auf den DNA- bzw. Proteingehalt der zugehörigen Gewebeprobe bezogen.

Mit unserer Methode war es nicht möglich, zwischen Carcinomen unterschiedlichen Differenzierungsgrades zu unterscheiden. Dagegen enthält normales Prostatagewebe signifikant mehr Östradiolrezeptoren als Carcinomgewebe ($p = 0,05$). Die Tendenz zu einer solchen Verteilung ist auch bei den DHT-Rezeptoren zu beobachten.

Klinische Verlaufsstudien an vier Patienten zeigen, daß solche Carcinomgewebe, die hinsichtlich ihres Rezeptorprofils am ehesten dem normalen Gewebe ähneln, am schlechtesten auf eine hormonelle Therapie ansprechen.

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Androstandiol	5alpha-Androstan-3alpha,17beta-diol
Androsteron	5alpha-Androstan-3alpha-ol-17-on
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
CBG	Cortisolbindendes Globulin
CC-assay	Charcoal-assay, s. 4.4.3.
cpm	counts per minute
DCC-assay	Dextran coated charcoal-assay
DHT	Dihydrotestosteron
DHT-R	Dihydrotestosteronrezeptor
Dihydrotestosteron	17beta-Hydroxy-5alpha-androstan-3-on
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E	Effektivität des Beta-Zählgerätes
Estradurin	Polyöstradiolphosphat
Honvan	Diäthylstilböstroldiphosphat
heißer Ansatz	Ansatz 1, s. 2.9.3.
kalter Ansatz	Ansatz 2, s. 2.9.3.
M	mol/l
Methyltrienolon	s. R1881
Moxestrol	s. R2858
NADase	NAD^+-Nucleosidase
$Ö_2$-R	Östradiolrezeptor
Östradiol	1,3,5 (10)-Östratrien-3,17beta-diol
Pg-R	Progesteronrezeptor
Progesteron	4-Pregnen-3,20-dion
Promegeston	s. R5020
R1881	17beta-Hydroxy-17alpha-methyl-oestra-4,9,11-trien-3-on
R5020	17alpha,21-Dimethyl-19-norpregna-4,9 (10)-dien-3,20-dion
sap	100 000g Überstand eines Gewebe-Puffer-Homogenats

SHBG	Sexualhormonbindendes Globulin
supprimierter Ansatz	s. kalter Ansatz
Testosteron	17beta-Hydroxy-4-androsten-3-on
Tris	Tris-(Hydroxymethylaminomethan)
TUR	Transurethrale Elektroresektion
V	Variationskoeffizient = relative Standardabweichung

7. LITERATURVERZEICHNIS

ANDERSON, K.M., LIAO, S.: Selective retention of DHT by prostatic nuclei.
Nature 219, S. 277 - 279 (1968)

ASSELIN, J., LABRIE, F., GARDEAU, Y., BONNE, C., RAYNAUD, J.P.: Binding of ^{3}H-Methyltrienolone, R1881, in rat prostate and human benign prostatic hypertrophy.
Steroids 28, S. 449 - 459 (1976)

AZADIAN-BOULANGER, G., BERTIN, D.: Synthèse et activité utérotrophique du 11beta-méthoxy estradiol, 11beta methoxy estriol et 11beta methoxy 17alpha ethinyl estradiol.
Chim. Therap. 8, S. 451 - 454 (1973)

BAACK, G., GEYER, H.: Stability of hormon receptors in tissues during storage.
J. clin. Chem. clin. Biochem. Vol. 18, Nr. 10, S. 726 (1980)

BAULIEU, E.E., JUNG, I., ROBEL, P.: Androgen receptors in rat ventral prostate.
Adv. in Biosciences 7, S. 179 - 190 (1970)

BELL, P.A., MUNCK, A.: Steroid binding properties and stabilisation of cytoplasmic glucocorticoid receptor from rat thymus cells.
Biochem. J. 136, S. 97 - 107 (1973)

BINOUX, M., ODELL, D.W.: Use of dextran coated charcoal to seperate antibody-bound from free hormone: a critique.
J. clin. Endocrinol. Metab. 36, S. 303 - 316 (1973)

BÖCKING, A., SINAGOWITZ, E., THON, W., NATTENMÜLLER, E., WAGNER, J., SANDRITTER, W.:
Histologisches Grading des Prostatacarcinoms.
Med. Welt., Band 30, S. 275 - 279 (1979)

BOESEL, R.W., KLIPPER, R.W., SHAIN, S.A.:
Androgen regulation of receptor content and distribution in the ventral and dorsolateral prostates of ageing AXC rats.
Steroids 35, S. 157 - 177 (1980)

BONNE, C., RAYNAUD, J.P.:
Methyltrienolone,a specific ligand for cellular androgen receptors.
Steroids 26, S. 227 - 232 (1975)

BRUCHOVSKY, N., WILSON, J.D.:
The intranuclear binding of testosterone and 5alpha-androstan-17beta-ol-3-one by rat prostate.
J. biol. Chem. 243, S. 5950 - 5953 (1968a)

BRUCHOVSKY, N., WILSON, J.D.:
The conversion of testosterone to 5alpha-androstan-17beta-ol-3-one by rat prostate in vivo and in vitro.
J. biol. Chem. 243, S. 2012 (1968b)

BURTON, K.:
A study of the conditions and mechanismus of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of desoxyribonucleic acid.
Biochem. J. 62, S. 315 - 322 (1956)

CONCOLINO, G., MAROCCHI, A., DI SILVERIO, F., LIBERTI, M.:
Androgen receptor in human prostatic cancer: an experience with methyltrienolone.
J. steroid. Biochem. 8, Abstract (1977)

CORPÉCHOT, C., BAULIEU, E., ROBEL, P.:
Testosterone dihydrotestosterone androstandiols in plasma, testes, prostates of rats during development.
Acta endcrinol. 96, S. 127 - 135 (1981)

CORVOL, P.: Physical properties and binding capacity of testosterone-estradiol-binding globulin in human plasma, determined by polyacrylamide gel electrophoresis.
J. biol. Chem. 246, 11, S. 3435 (1974)

COWAN, R.A., COWAN, S.K., GRANT, J.: Binding of methyltrienolone (R1881) to a progesteron-like component of human prostatic cytosol.
J. Endocrinol. 74, S. 281 - 289 (1977)

DINGJAN, P.G.: Steroid-Hormon Receptoren in Humaan Prostataweefsel.
Dissertation, Leiden (1978)

PIRKE, K.M., DOERR, P.: Age related changes and interrelationship between plasma testosterone, estradiol, and testosterone binding globulin in normal adult males.
Acta endocrinol. Kbh. 74, S. 792 - 807 (1973)

EKMAN, P.: Steroid-receptor content in human prostatic carcinoma and response to endocrine therapy.
Cancer 44, S. 1173 - 1188 (1979)

FANG, S., LIAO, S.: Receptor proteins for androgens. On the role of specific proteins in selective retention of 17beta-hydroxy-5alpha-androstane-3-one by rat ventral prostate in vivo and in vitro.
J. biol. Chem. 244, S. 6584 - 6595 (1969)

FIEDERER, B.: Dissertation Tübingen, in Vorbereitung

FLÜCHTER, S.H., MOELLER, H., RUMSCHIK, U., STINGEL, R., SCHMITZ-MOORMANN,P., GUPTA, D., BICHLER, K.H., OETTLING, G.: J. klin. u. exp. Urologie (1982)
(im Druck)

GELLER, J., CANTER, Th., ALBERT, J.: Evidence for a specific dihydrotestosterone binding cytosol receptor in human prostate. J. clin. Endocrin. Metab. 41, S. 854 - 862 (1975)

GHANADIAN, R., LEWIS, J.G., CHISHOLM, G.D.: Serum testosterone and dihydrotestosterone changes with age in rat. Steroids 25, S. 753 (1975)

GUSTAFFSON, J.A., EKMAN, P., POUSETTE, A., SNOWCHOWSKI, M., HÖGBERG, B.: Demonstration of progestin receptor in human benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. Invest. Urol. Vol 15 N°5, S. 361 - 366 (1978)

HAMMOND, G.L.: Endogenous steroid levels in the human prostate from birth to old age: a comparison of normal and diseased tissues. J. Endrocinol. 78, S. 7 - 19 (1978)

HEDINGER, Ch.: Männliche Geschlechtsorgane; In EDER M. und GEDIGK, P., (Herausgeber) Lehrbuch der allg. Pathologie und der patholog. Anatomie. Springer Verlag, S. 692 (1977)

De HERTHOG, R.: Unbound ligand adsorption on dextran coated charcoal: practical considerations. J. steroid. Biochem. 6.2, S. 1333 (1975)

HICKS, C.C., WALSH, P.C.: A microassay for the measurement of androgen receptors in the human prostatic tissue. Steroids 35, S. 389 - 406 (1979)

HOISAETER, P.A.: The androgen cytosol receptor in the ventral prostate of the rat: methodological problems. Biochem. biophys. Acta 317, S. 492 - 499 (1973)

HUGGINS, Ch.,
HODGES, C.V.:

Studies on prostatic cancer. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate.

Cancer Res. 1, S. 293 - 297 (1941)

JENSEN, E.V.,
JACOBSON, H.J.:

Basic guides to the mechanism of estrogen action.

Rec. prog. Hormone Res.
Vol XVIII, S. 387 - 408 (1962)

JENSEN, E.V.,
De SOMBRE, E.R.:

Mechanism of action of the female sex hormones.

Ann. Rev. Biochem. Vol 4.1, S. 203 (1972)

JOLY, R.,
WARNANT, J.,
FARCILLI, A.:

Prépararion du 17-methyl-19-norpregna-4,9-diène-3,20-dione.

Bull. Soc. Chim. 9, 10, S. 2694 - 2697 (1973)

JUNGBLUT, P.W.,
HUGHES, S.,
WAGNER, R.K.:

Evaluation of various methods for the assay of cytoplasmic estrogen receptors in extracts of calf uteri and human breast cancers.

Acta endocrinol. 70, S. 185 - 195 (1972)

KENT, J.R.,
BISCHOFF, A.J.,
ANDUINOL, J.,
MELLINGER, G.T.,
BYAR, D.P.,
HILL, M.,
KOZBUR, X.:

Estrogen dosage and suppression of testosterone levels in patients with prostatic carcinoma.

J. Urol. 109, S. 858 - 860 (1973)

KRIEG, M.,
VOIGT, K.D.:

Biochemical substrate of androgen actions at a cellular level in prostate, bulbocavernosus, levator ani and in skeletal muscle.

Acta endocrinol. Kbh. Suppl. 214, S. 43 (1977)

KRIEG, M., GROHE, I., VOIGT, K.D., ALTENÄHR, E., KLOSTERHALFEN, H.:
Human prostatic carcinoma: significant differences in its androgen binding and metabolism compared to the benign prostatic hypertrophy.
Acta endocrinol. 88, S. 397 - 407 (1978)

KUMMER, D.:
Steroid receptor determination by means of agargel electrophoresis.
Rec. Res. Cancer Res. 71, S. 14 - 15 (1980)

MAINWARING, W.I.P.:
The binding of (1,2 ^{3}H) testosterone withhin nuclei of the rat prostate.
Endrocrinology 44, S. 323 - 333 (1969a)

MAINWARING, W.I.P.:
The mechanism of action of androgens. Monographs on Endocrinology Vol.X.
Springer Verlag (1977)

MENON, M., TANANIS, C.E., Mc LAUGHLIN, M.G., WALSH, P.C.:
Androgen receptors in human prostatic tissue: a review.
Cancer Treat. Rep. 61, S. 265 - 271 (1977)

MENON, M., TANANIS, C.E., HICKS, L.L., HAWKINS, E.F., Mc LOUGHLIN, M.G., WALSH, P.C.:
Characterization of the binding of a potent synthetic androgen, methyl-trienolone, to human tissues.
J. clin. Invest. 61.1, S. 150 - 162 (1978)

MENON, M., WALSH, P.C.:
Hormonal therapy for prostatic cancer. In Murphy (Herausgeber)
Prostatic cancer P.S.G. Littleton, S. 175 - 200 (1979)

MILGROM, E., BAULIEN, E.E.:
A method for studying binding proteins, based upon differential dissociation of small ligand.
Biochem. Biophys. Acta 194, S. 602 - 605 (1969)

MILGROM, E., PERROT, M., ATGER, M., BAULIEU, E.E.: Progesterone in uterus and plasma: an assay of the progesterone cytosol receptor of the guinea pig uterus. Endocrinology 90, S. 1064 - 1070 (1972)

MOELLER, M., OETTLING, G., FIEDERER, B., GUPTA, D.: Receptor estimation through ^{3}H-5alpha dihydrotestosterone exchange. J. clin. Chem. clin. Biochem. Vol 18.10, S. 726 - 727 (1980)

MOELLER, H.: Bestimmung von Androgenrezeptoren durch Bindung von ^{3}H-Dihydrotesteron in Gegenwart von NAD^{+}-Nucleosidase. Anwendung auf Rattenprostata während der Pubertätsentwicklung und auf TUR-Späne von menschlicher Prostata. Habilitationsschrift, Tübingen (1981)

NOZU, K., TAMAOKI, M.: Formation, nuclear incorporation and enzymatic decomposition of androgen-receptor complex of rat prostate. J. steroid Biochem. 6.2, S. 1319 (1975)

OETTLING, G.: Dissertation Tübingen (in Vorbereitung)

PERTSCHUK, L.P., ZAVA, D.T., GAETJENS, E., MACCHIA, R.J., WISE, G.J., KIM, D.S., GRIGATI, D.J.: Histochemistry of steroid receptors in prostatic diseases. Ann. clin. lab. scien. Vol 9 N^{O}3, S. 225 - 229 (1979)

PFITZENMAIER, N., SCHMID, W., RÖHL, L.: Steroid hormone receptors in prostatic carcinomas and their relation to the response to endocrine therapy. Acta endocrinol. Suppl. 212, S. 148 (1977)

PHILIBERT, D., RAYNAUD, J.P.: Progesterone binding in the immature rabbit and guinea pig uterus. Endocrinology 94, S. 627 - 632 (1974)

PLASSE, J.C., REVOL, A., LISBOA, B.P.: In vitro conversion of 17beta-hydroxy-5alpha-reduced metabolites of testosterone by rat prostate.
Acta endocrinol. Kbh., Suppl 212, S. 152 (1977)

RAYNAUD,J.P.: R5020, a tag for the progestin receptor.
Prog. Cancer Res. Therap. Vol 4, S. 9 - 21 (1977)

ROSEN, V., JUNG, I., BAULIEU, E.E., ROBEL, P.: Androgen binding proteins in human benign prostatic hypertrophy.
J. Endocrin. Metab. 41, S. 761 - 770 (1975)

ROSNER, W., SMITH, R.N.: Isolation and characterization of the testosterone-estradiol binding globulin from human plasma. Use of a novel affinity column.
Biochemistry 14.4, S. 4813 - 4820 (1975)

SCHAFFNER, W., WEISMANN, C.: A rapid, sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution.
Anal. Biochem 56, S. 502 - 514 (1973)

SHAIN, S.A., AXELROD, L.R.: Reduced high affinity 5alpha dihydrotestosterone receptor capacity in the ventral prostate of the rat.
Steroids 21, S. 801 (1973)

SHAIN, S.A., BOESEL, R.W., AXELROD, L.R.: Ageing in the rat prostate.
Arch. Biochem. Biophys. 167, S. 247 - 263 (1975a)

SHAIN, S.A., BOESEL, R.W.: Saturation analysis of the binding of androgens, antiandrogens and estrogens by the cytoplasmic high affinity androgen receptor of the rat ventral prostate.
J. steroid. Biochem. 6.1, S. 42 - 50 (1975b)

SHAIN, S.A., BOESEL, R.W., LAMM, D.L., RADWIN, H.: Characterization of unoccupied (R) and occupied (RA) androgen binding components of the hyperplastic human prostate. Steroids 31, S. 541 - 556 (1978)

SHAIN, S.A., BOESEL, R.W., LAMM, D.L., RADWIN, H.: Cytoplasmic and nuclear androgen receptor content of normal and neoplastic human prostates and lymph node metastases of human prostatic carcinoma. J. Endocrin. Metab. 50, S. 704 - 711 (1980)

SIDH, S.M., YOUNG, J.D., KARMI, S.A., POWDER, J.R., BASHIRELAHI: Adenocarcinoma of the prostate: role of 17beta estradiol and 5alpha dihydrotestosterone binding proteins. Urology 13.6, S. 597 - 603 (1979)

SNOWCHOWSKI, M., POUSETTE, EKMAN, P., BRESSIOU, D., ANDERSSON, L., HÖGBERG, B., GUSTAFFSON, J.A.: Characterization and measurement of the receptor in human prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. J. Endocrin. Metab. 45, S. 920 - 930 (1977)

STAIB, W., BOJAR, W.H., BECK, K., PILASKI, J.: Investigation on the thermostability of steroid hormon receptors in lyophilized calf uterine powder. J. clin. Chem. clin. Biochem. 18.10, S. 726 (1980)

STINGEL, R.: Dissertation, Tübingen (in Vorbereitung)

SULLIVAN, J.N., STROTT, Ch.A.: Evidence for an androgen independent mechanism, regulating the levels of receptors in target tissue. J. biol. Chem. 248, S. 3202 - 3208 (1973)

TOFT, D.O., O'MALLEY, B.W.: Target tissue receptors for progesterone: the influence of estrogen treatment. J. Endocrinol. 90, S. 1041 - 1945 (1972)

TRÄGER, L.: Steroidhormone.
Springer Verlag (1977)

UNHJEM, O., TVETER, K.J., AAKVAAG, A.: Preliminary characterization of an androgen makro-molecular complex from the rat ventral prostate.
Acta endocrin. Kbh. 62, S. 153 - 164 (1969)

VELLUZ, L., NOMINE, G., BUCOURZ, R., MATHIEU, J.: Un analogue triénique de la téstostérone.
C.R. Acad. Sci. (D) Paris 257, S. 569 - 570 (1963)

VERHOEVEN, G.: A comparative study of the androgen receptor apparatus in rodents.
Ph. D. Thesis, Acco, Leuven (1974)

VERMEULEN, A., RUBENS, R., VERDONCK, L.: Testosterone secretion and metabolism in male senescence.
J. clin. Endocrinol + Metab. 34, S. 730 - 735 (1972)

DE VOOGT, H.J., DINGJAN, P.G.: Steroid receptors in human prostatic cancer: a preliminary evaluation.
Urol. Res. 6, S. 151 - 158 (1978)

WAGNER, R.K.: Characterisation and assay of steroid hormone receptors and steroid-binding Serum proteins by agargel electrophoresis at low temperature.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 253, S. 1235 - 1245 (1972)

WAGNER, R.K., SCHULZE, K.H.: Clinical relevance of androgen receptor content in human prostatic carcinoma.
Acta endocrinol. Kbh. Suppl 215, S. 139 - 140 (1978a)

WAGNER, R.K.: Extracellular and intra cellular steroid binding proteins: Properties, discrimination, assay and clinical application.
Acta endocrinol. Kbh. Suppl. 218 (1978b)

WESTPHAL, U.: Steroid-protein interactions. Monographs on endocrinology Vol IV.
Springer Verlag (1971)

WESTPHAL, U.: Zur Bindung von Steroidhormonen an Serumproteine.
Klin. Wschr. 55, S. 877 - 880 (1977)

WISER, F., KIRCHOFFER, M.O., MAUVAIS-JARVIS, P.: Antagonist action of dihydroprogesterone on the formation of the specific dihydrotestosterone-cytoplasmic receptor complex in rat ventral prostate.
J. Steroid. Biochem. Vol. 10, S. 419 - 429 (1978)

YOUNG, P., CLEARY, R.E.: Characterization and properties of progesterone binding components in the human endometrium.
J. of Endocrin. + Metab. 39, S. 425 - 439 (1974)

8. ANHANG

Erläuterungen zu den Wertetabellen

Die Berechnung der Rezeptorkonzentration in fmol/mg DNA bzw. fmol/mg Protein aus $fmol_{korr}/50\ \mu l$, der Konzentration an DNA bzw. Protein pro 1 mg Gewebe, und dem Gewicht der Gewebeprobe geschah auf folgende Weise:

1. $$\frac{fmol/50\ \mu l}{50} \times \mu l\ sap = fmol_{gesamt}$$

1a. $$\mu l\ sap \doteq \frac{Gewebegewicht + 600}{2}$$

Dies ist ein Erfahrungswert, der geringe Steuungen aufweisen kann.

2. $$\frac{\mu g\ \ DNA}{mg\ Gewebe} \times mg\ Gewebe = \mu g\ DNA_{gesamt}$$

3. $$\frac{fmol_{gesamt}}{\mu g\ DNA_{gesamt}} \times 1000 = \frac{fmol}{mg\ DNA}$$

Die Berechnung der Rezeptorenkonzentration in fmol/mg Protein erfolgt auf die gleiche Art, indem man statt

$\frac{\mu g\ DNA}{mg\ Gewebe}$, $\frac{\mu g\ Protein}{mg\ Gewebe}$ einsetzt.

Bei der quantitativen Bestimmung der zytoplasmatischen Dihydrotesteronrezeptoren erhobene Werte

Patient	Grading 0/Q	Gewicht(mg)	ug DNA/ mg Gewebe	ug Protein/ mg Gewebe	fmol korr/ 50 µl	fmol/ mg DNA	fmol/ mg Protein	Ansatz 1 / Ansatz 2
H.B.	0/0	116	0,0749	2,229	-4,076	-3358,99	-112,84	1,034
"	0/0	103	0,0921	0,687	1,825	1349,58	180,98	0,905
J.E.	3421/"	77	0,2169	24,0841	0,765	120,25	2,79	1,076
"	0/0	86	0,1056	5,430	1,736	1310,43	25,45	0,837
F.St.	3421/"	185	0,2238	11,159	-1,957	-55,786	-7,44	0,574
"	3421/"	142	0,2453	9,037	2,207	470,14	12,76	0,669
"	3421/"	66	0,2009	7,895	-2,060	-1034,65	-34,24	1,120
"	3421/"	62	0,3289	5,238	1,074	348,61	21,89	0,927
"	3421/"	181	0,1898	8,338	-0,883	-200,82	-4,56	1,080
"	3421/3221	148	0,2359	6,729	-0,633	-135,55	-4,75	1,058
"	3421/3221	139	0,1819	9,547	-2,707	-791,15	-15,08	1,521
A.St.	3242/3442	89	0,2923	4,357	0	0	0	0,991
"	3342/3442	143	0,3007	7,744	1,604	277,03	10,76	1,117
"	3222/3422	168	-	11,302	3,531	-	14,28	0,951
"	3242/3442	167	-	5,213	3,296	-	29,04	0,919
"	0/12	159	0,2458	12,529	0,193	37,44	0,73	1,076

Bei der quantitativen Bestimmung der zytoplasmatischen Dihydrotesteronrezeptoren erhobene Werte

Patient	Grading 0/0	Gewicht(mg)	µg DNA/ mg Gewebe	µg Protein/ mg Gewebe	$fmol_{korr}$/ 50 µl	fmol/ mg DNA	fmol/ mg Protein	Ansatz 1 / Ansatz 2
A.St.	0/13	151	0,1303	7,974	-0,177	-67,39	-1,10	1,007
A.W.	3442/"	179	0,2932	11,363	-0,765	-113,58	-2,93	1,105
"	3442/"	124	0,2220	5,159	0,765	201,18	8,66	1,020
"	3442/"	154	0,2688	7,298	-1,030	-187,54	-6,91	1,032
"	3442/"	45	0,3588	5,701	0,618	246,87	25,17	1,018
"	0/0	135	0,2016	13,592	1,295	349,70	5,18	1,187
"	3442/"	104	0,2216	3,505	-0,118	-35,96	-2,27	0,911
"	3442/"	127	0,1562	3,470	0,162	59,32	2,67	0,994
"	3442/"	150	0,1857	3,395	1,324	356,53	19,50	0,747
"	3442/"	128	0,1029	2,185	1,015	560,79	26,42	1,012
W.W.	0/0	130	0,0989	4,870	-0,279	-158,84	-3,22	0,928
"	0/0	170	0,2039	10,464	1,012	224,65	4,39	1,227
"	0/0	99	0,1841	11,803	-1,354	-518,99	-8,09	0,977
"	0/0	214	0,0529	15,304	5,812	4174,16	14,45	0,863
"	0/0	162	0,2313	13,125	-0,574	-116,67	-2,06	0,978
M.W.	3442/"	192	0,2624	11,299	0,529	83,25	1,93	0,839
"	0/0	119	0,1046	5,443	0,927	535,03	10,29	0,938
F.K.	0/0	115	0,0686	5,255	1,001	807,15	13,49	0,953
M.Z.	0/0	106	-	7,283	8,667	79,25	362	0,874

Bei der quantitativen Bestimmung des zytoplasmatischen Progesteronrezeptors erhobene Werte

Patient	Grading 0/0	Gewicht(mg)	µg DNA/ mg Gewebe	µg Protein/ mg Gewebe	fmol korr/ 50 µl	fmol/ mg DNA	fmol/ mg Protein	Ansatz 1 / Ansatz 2
H.B.	0/0	116	0,0749	2,229	4,510	3 716	124,87	0,977
"	0/0	103	0,0921	0,687	-1,147	-848,20	-113,75	0,937
J.E.	3421/"	77	0,2169	24,084	0,993	156,024	3,62	1,021
"	0/0	86	0,1056	7,393	-2,490	-1879,61	-36,58	1,044
F.St.	3421/"	185	0,2238	11,159	-0,642	-121,67	-2,44	0,888
"	3421/"	142	0,2453	9,037	0,291	61,98	1,68	1,079
"	3421/"	66	0,2009	7,895	0,359	180,52	5,97	0,819
"	3421/"	62	0,3289	5,238	-0,198	-38,88	-2,44	0,923
"	3421/"	181	0,1898	8,342	-9,902	-2252,92	-51,21	1,191
"	3421/3221	148	0,2359	6,729	-0,291	-62,34	-2,19	0,971
"	3421/3221	139	0,1819	9,547	-2,328	-680	-12,96	0,981
A.St.	3242/3442	89	0,2923	4,357	3,380	895,42	60,06	0,866
"	3342/3442	143	0,3007	7,745	0	0	0	1,042
"	3222/3422	168	-	11,302	3,766	-	15,23	1,062
"	3242/3442	167	-	5,213	1,181	-	10,40	1,059
"	0/12	159	0,2458	12,529	1,660	322,41	6,32	0,921
"	0/13	151	0,1303	7,974	0,736	280,92	4,59	0,969

Bei der quantitativen Bestimmung des zytoplasmatischen Progesteronrezeptors erhobene Werte

Patient	Grading 0/0	Gewicht(mg)	µg DNA/ mg Gewebe	µg Protein/ mg Gewebe	fmol korr/ 50 µl	fmol/ mg DNA	fmol/ mg Protein	Ansatz 1 / Ansatz 2
A.W.	3442/"	179	0,2932	11,363	1,754	260,42	6,72	0,996
"	3442/"	124	0,2221	5,151	-0,753	-198,02	-8,52	1,011
"	3442/"	154	0,2688	7,298	33,401	6081,86	224,08	1,370
"	3442/"	45	0,3588	5,701	-3,466	-1384,53	-141,17	0,974
"	0/0	135	0,2016	13,592	19,863	5364,61	79,56	1,000
"	3442/"	104	0,2216	3,505	-4,125	-1260,16	-79,67	0,964
"	3442/"	127	0,1562	3,470	-0,061	-21,95	-0,98	1,033
"	3442/	150	0,1857	3,395	3,654	983,87	53,82	0,836
"	3442/	128	0,1029	2,068	-2,362	-1304,75	-61,47	0,978
W.W.	0/0	130	0,0989	4,870	0,531	301,47	6,12	1,129
"	0/0	170	0,2039	10,464	-3,406	-756,47	-14,74	1,024
"	0/0	99	0,1841	11,803	3,072	1177,89	18,38	0,882
"	0/0	214	0,0529	15,304	-	-	-	-
"	0/0	162	0,2313	13,125	-1,429	-290,55	-5,12	0,951
M.W.	3442/"	192	0,2625	11,299	0,864	135,85	3,15	1,056
"	0/0	119	0,1046	5,444	-2,071	-1195,31	-22,98	1,271
F.K.	0/0	115	0,0686	5,255	-3,432	-3111,52	-46,28	1,103
M.Z.	0/0	106	-	7,283	-1,729	-	-15,81	0,971

Bei der quantitativen Bestimmung des zytoplasmatischen Östradiolrezeptors erhobene Werte

Patient	Grading 0/0	Gewicht (mg)	µg DNA/ mg Gewebe	µg Protein/ mg Gewebe	fmol korr/ 50 µl	fmol/ mg DNA	fmol/ mg Protein	Ansatz 1 / Ansatz 2
H.B.	0/0	116	0,0749	2,229	155,20	127 905	4297,03	1,040
"	0/0	103	0,0921	0,687	72,924	53 941	7233,81	1,067
J.E.	3421/"	77	0,2169	24,084	5,915	929,66	21,59	1,065
"	0/0	86	0,1056	7,393	4,650	3509,47	68,30	0,986
F.St.	3421/"	185	0,2238	11,159	-0,677	-128,31	-2,57	0,794
"	3421/"	142	0,2453	9,037	1,663	354,18	9,61	0,993
"	3421/"	66	0,2009	7,895	3,551	1783	59,03	1,001
"	3421/"	62	0,3289	5,238	2,560	830,93	52,19	0,952
"	3421/"	181	0,1898	8,342	13,154	2992,94	68,04	0,985
"	3421/3221	148	0,2359	6,729	2,178	466,56	16,36	1,025
"	3421/3221	139	0,1819	9,547	57,238	16725,98	318	1,003
A.St.	3242/3442	89	0,2923	4,357	-2,575	-682,08	-45,75	0,829
"	3342/3442	143	0,3007	7,745	4,105	709,13	27,54	1,076
"	3222/3422	168	-	11,302	0,853	-	3,45	0,959
"	3242/3442	167	-	5,213	3,473	-	30,59	0,53
"	0/0	159	0,2458	12,529	42,789	8309,51	63,02	0,946
"	0/13	151	0,1303	7,974	128,320	48978,97	800,35	1,138

Bei der quantitativen Bestimmung des zytoplasmatischen Östradiolrezeptors erhobene Werte

Patient	Grading 0/0	Gewicht(mg)	µg DNA/ mg Gewebe	µg Protein/ mg Gewebe	fmol korr/ 50 µl	fmol/ mg DNA	fmol/ mg Protein	Ansatz 1 / Ansatz 2
A.W.	3442/"	179	0,2932	11,363	3,943	585,38	15,10	0,996
"	3442/"	124	0,2221	5,1509	5,297	1392,80	59,95	0,967
"	3442/"	154	0,2688	7,298	-60,181	-10958,14	-423,74	0,626
"	3442/"	45	0,3588	5,701	2,501	999,24	101,88	1,120
"	0/0	135	0,2016	13,592	48,012	12967,10	192,32	0,915
"	3442/"	104	0,2216	3,505	2,325	710,33	44,90	1,156
"	3442/"	127	0,1562	3,470	0,118	43,14	1,94	0,973
"	3442/	150	0,1857	3,395	9,329	2511,72	137,38	0,953
"	3442/	128	0,1029	2,068	14,464	7989,83	376,44	1,012
W.W.	0/0	130	0,0989	4,870	14,420	8193,18	166,26	1,099
"	0/0	170	0,2039	10,464	42,259	9385,67	182,92	0,891
"	0/0	99	0,1841	11,803	53,486	20506,07	319,35	1,046
"	0/0	214	0,0529	15,304	-	-	-	
"	0/0	162	0,2313	13,125	24,087	4897,12	86,32	0,990
M.W.	3442/"	192	0,2625	11,299	3,075	483,32	11,23	1,047
"	0/0	119	0,1046	5,444	30,752	17749,04	341,31	1,067
F.K.	0/0	115	0,0686	5,255	-2,693	-2441	-36,32	1,159
M.Z.	0/0	106	-	7,283	127,330	-	1164,44	1,186

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die mich während meiner Arbeit an der vorliegenden Dissertation unterstützt und beraten haben.

Mein Dank gilt ganz besonders Herrn Dr.med.habil. Hans Moeller. Während der experimentellen Arbeiten war er stets für alle Fragen offen und immer bemüht, mir jede denkbare Hilfe zuteil werden zu lassen. Seine Geduld bei der Durchsicht und Korrektur des Manuskripts hat die vorliegende Arbeit sicher in vielen Teilen bereichert.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Günther Oettling. In angeregten Diskussionen mit ihm konnte ich mein Verständnis für die theoretischen Grundlagen der Methodik vertiefen. Das gleiche gilt auch für meine Freunde und Studienkollegen Bernhard Fiederer und Rolf Stingel. Da sie zur gleichen Zeit wie ich auf wesensverwandten Gebieten arbeiteten, kam ein reger Gedankenaustausch zustande, der mir zu einem größeren Überblick über das Feld der Rezeptorforschung verhalf. Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt (Mo 315/1, 2 - 3).
Herrn Dr.med. Stefan Flüchter (Urologische Universitätsklinik Tübingen) stellte mir menschliches Untersuchungsmaterial zur Verfügung und half mit vielen Anregungen im Hinblick auf die klinischen Aspekte dieser Arbeit.

Der Persönlichkeit von Herrn Prof.Dr. Derek Gupta, dem Leiter der Abteilung für endokrinologische Laboratoriumsdiagnostik der Universitätskinderklinik Tübingen, habe ich die vorzüglichen Arbeitsbedingungen, die ich im "Hormonlabor" vorfand zu verdanken. Dies gilt in gleicher Weise für das angenehme Arbeitsklima, wie auch hinsichtlich der technischen Ausrüstung.

Ihnen allen danke ich herzlich.

LEBENSLAUF

Ich, Ulrich Rumschik, wohnhaft in 7987 Weingarten, Boschstraße 53, wurde am 17.06.1958 als Sohn des Feinmechanikers Hellmut Rumschik und seiner Ehefrau Inge in Ravensburg geboren.

Von 1965 bis 1968 besuchte ich die Grundschule in Weingarten, von 1968 bis 1977 das Albert-Einstein Gymnasium in Ravensburg. Dort legte ich am 05.05.1977 die Reifeprüfung ab.

In der Zeit von Juli 1977 bis März 1978 leistete ich neun Monate meines Grundwehrdienstes ab und wurde im April 1978 zur Aufnahme meines Studiums vorzeitig aus der Bundeswehr entlassen. Von 1978 bis 1984 war ich an der Eberhard-Karls Universität Tübingen immatrikuliert.

Im Sommer 1980 begann ich dort unter Anleitung von Herrn Priv.-Doz.Dr.H. Moeller, Universitätskinderklinik Tübingen, mit den experimentellen Arbeiten zu meiner Dissertation, deren schriftliche Ausarbeitung im Winter 1982/83 abgeschlossen wurde.

Von April 1983 bis April 1984 absolvierte ich das Praktische Jahr an Lehrkrankenhäusern der Universität Tübingen in Stuttgart mit dem Wahlfach Radiologie. Dort schloß ich am 13.04.84 mein Studium mit dem Staatsexamen ab.